

**(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)**

**(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle**
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
19 septembre 2002 (19.09.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/072820 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
C12N 15/10, A01K 67/027, C12Q
1/00, C12N 15/20, 15/24, 15/62, 15/10

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR02/00837

(22) Date de dépôt international : 8 mars 2002 (08.03.2002)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
01/03272 9 mars 2001 (09.03.2001) FR

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (regional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
GENOWAY [FR/FR]; 46, allée d'Italie, F-69007 Lyon (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : THIAM, Kader [SN/FR]; 144, avenue Maréchal de Saxe, F-69003 Lyone (FR). FRAICHARD, Alexandre [FR/FR]; 20 bis, rue du Lieutenant Colonel Girard, F-69007 Lyon (FR). LAPIZE-GAUTHEY, Christine [FR/FR]; 4, rue Latreille, F-38200 Vienne (FR).

(74) Mandataires : MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 20, rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17 (FR).

(54) Title: TRANSGENIC CELLS AND ANIMALS FOR THE STUDY OF THE POLARIZATION OF THE IMMUNE RESPONSE

(54) Titre : CELLULES ET ANIMAUX TRANSGENIQUES D'ETUDE DE LA POLARISATION DE LA REPONSE IMMUNE

WO 02/072820 A1

(57) Abstract: The invention relates to a transgenic non-human animal cell expressing at least one transgene coding for at least one reporter protein, characterized in that the expression of said reporter protein is correlated to the expression of at least one protein which is naturally produced by said cell and which is specific for a type of polarization of the immune response and/or an effector function of the immune response. The invention also relates to a corresponding transgenic animal. According to the invention, the cell and the transgenic animal can be used in a method for characterizing the type of immune response, i.e. Th1 and Th 2, caused by an immunogene, a pathogen or chemical agent.

(57) Abrégé : La présente invention concerne une cellule animale transgénique non humaine exprimant au moins un transgène codant pour au moins une protéine rapporteuse, caractérisée en ce que l'expression de ladite protéine rapporteuse est corrélée à l'expression d'au moins une protéine naturellement produite par ladite cellule et spécifique d'un type de polarisation de la réponse immune et/ou d'une fonction effectrice de la réponse immune. L'invention porte également sur l'animal transgénique correspondant. La cellule et l'animal transgénique selon l'invention peuvent être mise en oeuvre dans un procédé pour caractériser le type de réponse immune, notamment Th1 et Th2, induite par un immunogène, un agent pathogène ou agent chimique.

CELLULES ET ANIMAUX TRANSGENIQUES D'ETUDE DE LA
POLARISATION DE LA REPONSE IMMUNE.

La présente invention concerne le domaine de la
5 biologie et plus particulièrement le domaine de la transgenèse animale. L'invention se rapporte à une cellule animale transgénique non humaine exprimant au moins un transgène codant pour au moins une protéine rapporteuse, caractérisée en ce que l'expression de
10 ladite protéine rapporteuse est corrélée à l'expression d'au moins une protéine naturellement produite par ladite cellule et spécifique d'un type de polarisation de la réponse immune et/ou d'une fonction effectrice de la réponse immune. L'invention porte également sur l'animal
15 transgénique correspondant. La cellule et l'animal transgénique selon l'invention peuvent être mise en œuvre dans un procédé pour caractériser le type de réponse immune, notamment Th1 et Th2, induite par un immunogène. Une méthode de criblage de composés qui modulent le type
20 de polarisation de la réponse immune et/ou le type de fonction effectrice de la réponse immune est également revendiquée.

Une réponse immune spécifique contre des pathogènes résulte de la combinaison de paramètres multiples qui
25 incluent la production précoce de certaines cytokines et chimiokines, l'induction de la synthèse de molécules cellulaires de surface, des interactions cellule/cellule et l'activation d'un certain nombre de types cellulaires différents. Typiquement, deux types principaux d'immunité
30 acquise sont à distinguer en fonction de la nature du pathogène. Des microorganismes intracellulaires tels que les virus, tels que certains types de bactéries et protozoaires induisent des réponses immunes médiées par les cellules T cytotoxiques et une production de

cytokines inflammatoires tel que l'interféron γ , l'interleukine 1, le TNF α , dont le but est d'induire une résistance à l'infection et/ou d'éliminer les cellules infectées. Les pathogènes extra-cellulaires tels que les 5 helminthes induisent, quant à eux, une réponse humorale associée à la production d'anticorps spécifiques qui neutralisent l'antigène.

La polarisation appropriée de l'une ou de l'autre des 10 réponses est cruciale pour assurer une élimination efficace du pathogène. Cette polarisation nécessite la différenciation des cellules T CD4+ naïves en cellules effectrices Th1/Th2. Cette étape constitue un élément majeur de la décision du type de réponse immune (Mossmann et al., 1986 ; Mossmann et al., 1989 ; 15 Romagnani, 1999). L'aptitude des différents sous-types de cellules T à diriger les réponses immunes effectrices sont dues à une combinaison exclusive de cytokines qui sont exprimées entre autre dans un sous-type de cellules Th particulier. Ainsi, chez l'homme, comme chez la 20 souris, les cellules Th1 produisent préférentiellement de l'interleukine 2 et de l'interféron γ ; ces cellules Th1 sont à l'origine d'une réponse de type hypersensibilité retardée, alors que les cellules Th2 sécrètent, quant à elles, de l'interleukine 4, de l'interleukine 5, de 25 l'interleukine 10 et induisent l'activation des cellules B et la production d'anticorps. Un déséquilibre dans les réponses Th1/Th2 a été observé dans des situations cliniques variées telles par exemple l'allergie atopique (médierée par les IgE), notamment l'asthme, la rhinite 30 allergique, mais également les rejets de greffe, les maladies du greffon contre hôte, les leishmanioses, la lèpre, la tuberculose, ou les maladies inflammatoires chroniques telle que la maladie de Crohn, l'arthrite réactive, le diabète insulino-dépendant. Il a été suggéré

de manipuler la réponse Th1/Th2 pour développer des vaccins de meilleure qualité, de nouvelles approches anti-tumorales et des stratégies immunoprophylaxiques alternatives pour la thérapie des allergies et des maladies auto-immunes. Ainsi, un effort constant est réalisé pour augmenter la compréhension des mécanismes impliquant le rapport Th1/Th2 ou pour découvrir de nouvelles molécules qui pourraient altérer ces deux processus. Les réponses Th1/Th2 sont habituellement étudiées en contrôlant le type cellulaire et l'expression des marqueurs de surfaces cellulaires, ainsi que la production de cytokines soit dans le sérum, soit dans les organes lymphoïdes. Des méthodes, telles que la méthode ELISA, des méthodes de RT-PCR quantitative et de cytométrie de flux sont communément utilisées. La plupart de ces essais sont longs et laborieux car ils nécessitent un grand nombre de manipulations. Ces méthodes ne sont pas adaptées pour tester une multitude de conditions expérimentales ; ces méthodes peuvent en outre fausser l'analyse car elles peuvent altérer la réponse naturelle des cellules, comme par exemple dans le cas de méthodes qui impliquent une réactivation *ex vivo* des cellules T. Pour pallier ces différents inconvénients de l'art antérieur, des modèles animaux permettant une caractérisation rapide du type de la réponse immune constituerait des outils extrêmement appréciables pour réaliser ces études. En effet, de tels modèles animaux permettraient d'obtenir une réponse rapide, facile, reproductible et sûre de la réponse biologique naturelle et permettrait d'identifier de manière fiable les paramètres Th1/Th2.

C'est la raison pour laquelle les inventeurs se proposent de développer de nouveaux modèles en manipulant le génome animal, notamment murin, afin que le type de

réponse immune soit directement représenté par l'expression d'un gène rapporteur spécifique. La présente invention vise donc à fournir une cellule animale transgénique non humaine exprimant au moins un transgène codant pour au moins une protéine rapporteuse, caractérisée en ce que l'expression de ladite protéine rapporteuse est corrélée à l'expression d'au moins une protéine naturellement produite par ladite cellule et spécifique d'un type de polarisation de la réponse immune 10 et/ou d'une fonction effectrice de la réponse immune.

Par les termes « l'expression de ladite protéine rapporteuse est corrélée à l'expression d'au moins une protéine naturellement produite », on entend indiquer que l'expression de la protéine rapporteuse est associée 15 directement ou indirectement à l'expression de la protéine naturellement produite. Ainsi, lorsque la protéine naturellement produite est exprimée, respectivement non-exprimée, la protéine rapporteuse est également exprimée, respectivement non-exprimée. De 20 préférence, le taux d'expression de la protéine rapporteuse sera directement proportionnel au taux d'expression de la protéine naturellement produite. Ainsi à titre d'exemple, lorsque le taux d'expression de la protéine naturellement produite est élevé, respectivement 25 faible, le taux d'expression de la protéine rapporteuse est élevé, respectivement faible. Comme on le verra par la suite, cette corrélation est obtenue de préférence en plaçant le gène rapporteur sous le contrôle des éléments de régulation de l'expression du gène codant pour la 30 protéine naturellement produite, sans invalider l'expression de ce gène; Dans ce cas l'expression des deux gènes est régulée en CIS, c'est-à-dire que l'expression de la protéine rapporteuse est directement associée à l'expression de la protéine naturellement

produite. Cette corrélation peut également être obtenue en plaçant le gène rapporteur sous le contrôle d'éléments de régulation de la transcription inductible par la protéine naturellement produite ou l'une des protéines de la cascade métabolique induite par l'expression de la protéine naturellement produite. Dans ce cas l'expression des deux gènes est régulée en TRANS, c'est-à-dire que l'expression de la protéine rapporteuse est indirectement associée à l'expression de la protéine naturellement produite.

La cellule selon la présente invention se caractérise en outre par le fait que pour chaque type de polarisation de la réponse immune et/ou pour chaque type de fonction effectrice correspond une protéine rapporteuse distincte ce qui permet de distinguer aisément, rapidement, simultanément le ou les types de polarisation de la réponse immune et/ou le type de fonctions effectrices impliquées dans la réponse de la cellule ou de l'animal selon l'invention à un ou plusieurs immunogènes ou agents pathogènes.

Par polarisation de la réponse immune, on entend désigner la nature de la réponse immune, cellulaire ou humorale, qui suit la première rencontre avec un antigène. Parmi la réponse immune à médiation cellulaire, il convient de distinguer différents sous-types de polarisation tels que, de manière non exhaustive, la réponse immune médiée par les lymphocytes T auxiliaire (« T helper »), les lymphocytes T répresseurs (Groux et al., 1997), les lymphocytes T cytotoxiques, les cellules NK, les cellules K et le type humorale. De préférence, il s'agit du type de polarisation « T helper » qui est choisi parmi les types Th0 (Firestein et al., 1989), Th1, Th2, Th3, Tr1. De préférence, il s'agit du type Th1 (Mossmann et al., 1986 ; Mossmann et al., 1989 ; Del

Prete et al., 1991 ; Wiernenga et al., 1990 ; Yamamura et al., 1991 ; Robinson et al., 1993) et Th2. Parmi la réponse immune humorale, il convient de citer la réponse immune médiee par les lymphocytes B.

5 Les types de fonction effectrice de la réponse immune au sens de la présente invention comprennent de manière non exhaustive les activités ou fonctions CTL, les activités ou fonctions phagocytaires, les activités ou fonctions cytotoxiques, les activités ou fonctions 10 immuno-suppressives, les activités ou fonctions de présentation d'antigènes, les activités ou fonctions d'activation cellulaire.

Par fonction effectrice, on entend désigner une fonction cellulaire d'un ou plusieurs types de cellules 15 ayant une résultante effectrice sur une type donnée de cellules cibles. Ces fonctions participent à la mise en place d'une immunité protectrice et/ou au développement d'une réponse immune adéquate telle le contrôle d'une réponse immune exacerbée par exemple.

20 Par « protéine naturellement exprimée », on entend désigner une protéine exprimée à partir d'un gène présent dans son environnement chromatinien naturel, qui de ce fait présente une régulation naturelle de son expression. Ainsi, de manière très préférée, le gène codant pour la 25 protéine naturellement exprimée n'a pas été introduit par transfection ou transgenèse dans la cellule ; il s'agit d'un gène dit endogène.

L'invention peut être réalisée dans n'importe quelle cellule de mammifère compétente pour la recombinaison 30 homologue. De préférence, il s'agit de cellules de rongeurs, notamment de souris, de rat, de hamster, de cobaye. De préférence, il s'agit de cellules de souris. Alternativement, il s'agit de cellules de primates, à l'exception de l'homme, tels que les singes, chimpanzés,

macaques, babouins. Il peut également s'agir de cellules de bovins, de caprins, d'ovins, de porcins, notamment de mini-porcs, de chevaux, de lapins.

Les cellules selon l'invention peuvent être définies 5 fonctionnellement comme étant capables de réaliser la recombinaison homologue du ou des fragment(s) d'ADN exogène qui contient au moins une, de préférence deux, région(s) ayant des homologies de séquences avec une séquence d'ADN cellulaire endogène. De telles cellules 10 contiennent naturellement des recombinases endogènes ou ont été génétiquement modifiées pour en contenir ou pour contenir les composés nécessaires pour réaliser la recombinaison de l'ADN.

De manière préférée, parmi les cellules selon 15 l'invention, il convient de citer tous les types cellulaires exprimant naturellement des protéines spécifiques impliquées dans un ou plusieurs types de polarisation de la réponse immune et/ou des protéines spécifiques impliquées dans les mécanismes de 20 communication cellulaire et dans la mise en place d'une ou plusieurs fonctions effectrices de la réponse immune. Les gènes codant pour ces protéines spécifiques, appelés dans la présente invention, gènes endogènes, codent de 25 préférence pour des protéines solubles, des protéines intracellulaires ou membranaires, impliquées dans la signalisation intracellulaire et dans la communication cellulaire. Il s'agit de protéines du système immunitaire, telles par exemple les cytokines, chimiokines, lymphokines, les protéines de surface 30 cellulaires (marqueurs de différenciation CD, récepteurs membranaires), des protéines impliquées dans la transduction du signal associé à différents types de récepteurs, et/ou dans l'activation de gènes cibles. Selon un mode particulier et préféré de l'invention, la

protéine naturellement produite et spécifique de la polarisation de type Th1 est choisie parmi de manière non exhaustive parmi l'interleukine 2 (IL-2), l'interleukine 12 (IL-12), l'interleukine 18 (IL-18), l'interféron γ , le 5 TNF- β , le TNF- α T-bet, STAT-4, la chaîne β du récepteur l'interféron γ (IFN- γ), les chaînes du récepteur à l'IL-12 et à l'IL-18, RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , CD26, la chaîne β 2 du récepteur à l'interleukine 12 (IL-12R β 2), CCR5, CCR2, CXCR3. De préférence, la protéine spécifique de la 10 polarisation de type Th1 est l'IFN- γ . La protéine spécifique de la polarisation de type Th2 est choisie de préférence dans le groupe composé de manière non exhaustive de l'interleukine 3 (IL-3), l'interleukine 4 (IL-4), l'interleukine 5 (IL-5), l'interleukine 10 (IL-10), l'interleukine 13 (IL-13), GATA-3, STAT-6, c-maf, 15 NFAT, NIP45, CD30, CD26L, ST2L, CCR3, CCR4, CCR8, CXCR4, CTRH2, STIF (WO 98 46 638). De manière préférée, la protéine spécifique de la polarisation de type Th2 est l'interleukine 4 (IL-4). Parmi ces cellules, il convient 20 de citer les cellules du système immunitaire et de manière non exhaustive, les lymphocytes T, les cellules NK, les cellules K, les lymphocytes B, les basophiles, les mastocytes, les macrophages, les éosinophiles, les monocytes, les neutrophiles, les plaquettes, les cellules de 25 Langerhans, les monocytes des cellules dendritiques. Les cellules selon l'invention peuvent également être par exemple des cellules neuronales. Il convient également de citer les cellules qui dans certaines conditions de culture, ou après différenciation ou manipulation 30 génétique sont capables d'exprimer des protéines spécifiques impliquées dans un ou plusieurs types de polarisation de la réponse immune et/ou des protéines spécifiques impliquées dans une ou plusieurs fonctions

effectrices de la réponse immune. On peut citer les cellules souches hématopoïétiques, les cellules souches embryonnaires totipotentes (cellules ES) ou pluripotentes. Ces cellules souches peuvent se différencier en une cellule exprimant les protéines spécifiques selon l'invention. Par cellules souches, on entend désigner tous les types de cellules indifférenciées multipotentes ou pluripotentes, cultivables *in vitro* de façon prolongée sans perdre leurs caractéristiques, et qui sont susceptibles de se différencier en un ou plusieurs types cellulaires lorsqu'elles sont placées dans des conditions de culture définies. Ainsi, lorsque la cellule selon l'invention est une cellule ES ou une cellule hématopoïétique, on peut envisager d'induire la différenciation de celle-ci en différents types cellulaires susceptibles d'exprimer la ou les protéines spécifiques de la réponse immune tels par exemple les cellules neuronales et les cellules du système immunitaire, et plus précisément les mastocytes, les basophiles, les monocytes, les éosinophiles, les lymphocytes T, les cellules NK, les cellules K, les lymphocytes B, les cellules de Langerhans, les plaquettes, les monocytes des cellules dendritiques.

Lorsqu'il est nécessaire d'employer des cellules souches embryonnaires (ES), pour la production de l'animal transgénique selon l'invention par exemple, une lignée cellulaire de cellules ES peut être employée ou des cellules embryonnaires peuvent être obtenues fraîchement à partir d'un hôte animal selon l'invention, en général d'une souris, d'un rat, d'un hamster, d'un cobaye. De telles cellules sont cultivées sur une couche de fibroblastes nourriciers appropriés ou sur de la gélatine, en présence de facteurs de croissance

appropriés tels que du facteur inhibiteur de leucémie (LIF pour « *Leukemia Inhibiting Factor* »).

Plus généralement les cellules selon l'invention correspondent à toutes les cellules animales, de 5 préférence de mammifères, à l'exception des cellules humaines. Des exemples de cellules de mammifères compétentes pour la recombinaison comprennent donc les fibroblastes, les cellules endothéliales, les cellules épithéliales, les cellules habituellement cultivées en 10 laboratoire telles les cellules Hela, les cellules CHO (« *Chinese Hamster Ovary* »), Dorris, AE7, D10.64, DAX, D1.1, CDC25 par exemple.

Au sens de la présente invention, on entend désigner par transgénique une cellule comportant un transgène. On 15 entend désigner par « transgène » ou par séquence d'acides nucléiques exogène ou par gène exogène du matériel génétique qui a été ou qui va être inséré artificiellement dans le génome d'un mammifère, particulièrement dans une cellule de mammifère cultivée 20 *in vitro* ou dans une cellule de mammifère vivant, ou qui va se maintenir dans la dite cellule sous forme épisomale. De manière préférée, le transgène selon la présente invention comprend au moins une séquence susceptible d'être transcrise ou transcrise et traduite 25 en protéine. Le ou les transgènes selon l'invention ou leur expression n'affecte(nt) pas le fonctionnement du réseau biologique du système immunitaire, ni plus généralement le fonctionnement du réseau biologique de la cellule. Le transgène peut être cloné dans un vecteur de 30 clonage qui permet d'en assurer sa propagation dans une cellule hôte, et/ou facultativement dans un vecteur d'expression pour assurer l'expression du transgène. Les technologies de l'ADN recombinant utilisées pour la construction du vecteur de clonage et/ou d'expression

selon l'invention sont celles connues et communément utilisées par les hommes de l'art. Les techniques standard sont utilisées pour le clonage, l'isolement de l'ADN, l'amplification, et la purification ; les 5 réactions enzymatiques impliquant l'ADN ligase, l'ADN polymérase, les endonucléases de restriction sont effectuées selon les recommandations du fabricant. Ces techniques et les autres sont généralement réalisées selon Sambrook et al., 1989). Les vecteurs incluent des 10 plasmides, les cosmides, les phagemides, les bactériophages, les rétrovirus et autres virus animaux, les chromosomes artificiels, tels les YAC, BAC, HAC et autres vecteurs analogues.

Les méthodes pour générer des cellules transgéniques 15 selon l'invention sont bien connues de l'homme de l'art (Gordon et al., 1989). Diverses techniques pour transfacter des cellules de mammifères ont été décrites (pour revue, voir Keon et al., 1990). Le transgène selon l'invention, facultativement compris dans un vecteur 20 linéarisé ou non, ou sous la forme d'un fragment de vecteur, peut être introduit dans la cellule hôte par des méthodes standard telles que par exemple la micro-injection dans le noyau (US 4 873 191), la transfection par précipitation au phosphate de calcium, la 25 lipofection, l'électroporation (Lo, 1983), le choc thermique, la transformation avec des polymères cationiques (PEG, polybrène, DEAE-Dextran...), l'infection virale (Van der Putten et al., 1985), le sperme (Lavitrano et al., 1989).

30 Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, la cellule transgénique selon l'invention est obtenue par ciblage génique (« gene targeting ») du ou des transgène(s) au niveau d'une ou des séquences du génome de la cellule hôte. Plus précisément, le transgène est

inséré de manière stable par recombinaison homologue au niveau de séquences homologues dans le génome de la cellule hôte. Lorsqu'il s'agit d'obtenir une cellule transgénique en vue de produire un animal transgénique, 5 la cellule hôte est de préférence une cellule souche embryonnaire (cellule ES) (Thompson et al., 1989).

Le ciblage génique représente la modification dirigée d'un locus chromosomique par recombinaison homologue avec une séquence d'ADN exogène ayant une homologie de 10 séquence avec la séquence endogène ciblée. On distingue différents types de ciblage génétique. Ainsi le ciblage génique peut être utilisé pour modifier, en général augmente l'expression d'un ou de plusieurs gène(s) endogène(s), ou pour remplacer un gène endogène par un 15 gène exogène, ou pour placer un gène exogène sous le contrôle d'éléments de régulation de l'expression génique de gène endogène particulier qui reste actif. Dans ce cas, il le ciblage génique est appelé « Knock-in » (KI). Alternativement, le ciblage génique peut être utilisé 20 pour diminuer ou annuller l'expression d'un ou plusieurs gènes. Il s'agit alors de ciblage génique appelé « Knock-out » (KO) (voir Bolkey et al., 1989).

Selon la présente invention, l'intégration dans le génome de ladite cellule dudit transgène codant pour au 25 moins une protéine rapporteuse constitue un « Knock-in » ; il est réalisé au niveau dudit ou desdits gènes endogènes codant pour une ou des protéines spécifiques d'un type de polarisation de la réponse immunitaire et/ou d'un type de fonction effectrice de la réponse immunitaire sans que 30 ledit transgène n' invalide l'expression dudit gène endogène, ou que l'expression dudit transgène n'affecte le réseau biologique de la cellule. La cellule selon l'invention se caractérise en ce que le transgène est intégré de manière stable dans le génome de ladite

cellule, et en ce que son expression est contrôlée par les éléments de régulation du gène endogène codant pour ladite protéine naturellement produite et spécifique d'un type de polarisation de la réponse immune et/ou d'une fonction effectrice de la réponse immune. Par intégration de manière stable, on entend signifier l'insertion du transgène dans l'ADN génomique de la cellule selon l'invention. Le transgène ainsi inséré est ensuite transmis à la descendance cellulaire. L'intégration du transgène est réalisée en amont, en aval ou au milieu du gène endogène cible. De préférence, le transgène comprend une séquence de reprise de la traduction telle par exemple une séquence IRES (site d'entrée interne des ribosomes) (Mountford et al., 1995 ; Zhu et al., 1999 ; Liu et al., 2000), ladite séquence étant située entre la séquence codante de ladite protéine rapporteuse et de la séquence codante de ladite protéine spécifique d'un type de polarisation de la réponse immune et/ou d'une fonction effectrice de la réponse immune. Selon un mode préféré de réalisation, la cellule selon l'invention exprime un ou plusieurs transgènes, de préférence deux transgènes codant chacun pour une protéine rapporteuse distincte, l'expression de chaque protéine rapporteuse étant spécifique d'un type de polarisation de la réponse immune et de préférence du type Th1 ou Th2. Plus particulièrement, la cellule animale transgénique non-humaine selon l'invention se caractérise en ce qu'elle exprime (a) un premier transgène codant pour une première protéine rapporteuse, ledit premier transgène étant intégré par recombinaison homologue (« Knock-In ») au niveau d'un gène animal endogène codant pour une protéine spécifique du type Th1 de polarisation de la réponse immune sans invalider l'expression dudit gène a endogène, l'expression dudit premier transgène étant corrélée avec

l'expression dudit gène animal endogène ; et/ou (b) un second transgène codant pour une deuxième protéine rapporteuse, distincte de ladite première protéine rapporteuse, ledit second transgène étant intégré par 5 recombinaison homologue (« Knock-In ») au niveau d'un gène endogène codant pour une protéine spécifique du type Th2 de polarisation de la réponse immune, sans invalider l'expression dudit gène endogène, l'expression dudit second transgène étant corrélée avec l'expression dudit 10 gène endogène.

Pour réaliser la recombinaison homologue il est nécessaire que le transgène contiennent au moins une séquence d'ADN comprenant au moins le gène rapporteur, avec éventuellement les modifications génétiques désirées 15 et facultativement un ou plusieurs gènes de sélection positive ou négative, et également des régions d'ADN d'homologie avec le locus cible, de préférence au nombre de deux, situé de part et d'autre de la portion du gène rapporteur. Par «régions d'ADN d'homologies» ou 20 «séquences d'ADN homologues ou substantiellement homologues», on entend désigner deux séquences d'ADN qui, après un alignement optimal et après comparaison, sont identiques pour environ au moins environ 75% des nucléotides, au moins environ 80% des nucléotides, 25 habituellement au moins environ 90% à 95% des nucléotides et, de manière plus préférée, au moins environ 98 à 99,5% des nucléotides. Par «pourcentage d'identité» entre deux séquences d'acides nucléiques au sens de la présente invention, on entend désigner un pourcentage de 30 nucléotides identiques entre les deux séquences à comparer, obtenu après le meilleur alignement, ce pourcentage étant purement statistique et les différences entre les deux séquences étant réparties au hasard et sur toute leur longueur. On entend désigner par "meilleur

alignement" ou "alignement optimal", l'alignement pour lequel le pourcentage d'identité déterminé comme ci-après est le plus élevé. Les comparaisons de séquences entre deux séquences d'acides nucléiques sont traditionnellement réalisées en comparant ces séquences après les avoir alignées de manière optimale, ladite comparaison étant réalisée par segment ou par « fenêtre de comparaison » pour identifier et comparer les régions locales de similarité de séquence. L'alignement optimal des séquences pour la comparaison peut être réalisé, autre manuellement, au moyen de l'algorithme d'homologie locale de Smith et Waterman (1981), au moyen de l'algorithme d'homologie locale de Neddleman et Wunsch (1970), au moyen de la méthode de recherche de similarité de Pearson et Lipman (1988), au moyen de logiciels informatiques utilisant ces algorithmes (GAP, BESTFIT, BLAST P, BLAST N, FASTA et TFASTA dans le Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI). Afin d'obtenir l'alignement optimal, on utilise de préférence le programme BLAST, avec la matrice BLOSUM 62. On peut également utiliser les matrices PAM ou PAM250. Le pourcentage d'identité entre deux séquences d'acides nucléiques est déterminé en comparant ces deux séquences alignées de manière optimale, la séquence d'acides nucléiques ou d'acides aminés à comparer pouvant comprendre des additions ou des délétions par rapport à la séquence de référence pour un alignement optimal entre ces deux séquences. Le pourcentage d'identité est calculé en déterminant le nombre de positions identiques pour lesquelles le nucléotide ou le résidu d'acide aminé est identique entre les deux séquences, en divisant ce nombre de positions identiques par le nombre total de positions comparées et en multipliant le résultat obtenu par 100 pour obtenir le

pourcentage d'identité entre ces deux séquences. Par séquences nucléiques présentant un pourcentage d'identité d'au moins 85 %, de préférence d'au moins 90 %, 95 %, 98 % et 99 % après alignement optimal avec une séquence de 5 référence, on entend désigner les séquences nucléiques présentant, par rapport à la séquence nucléique de référence, certaines modifications comme en particulier une délétion, une troncation, un allongement, une fusion chimérique, et/ou une substitution, notamment ponctuelle, 10 et dont la séquence nucléique présente au moins 85 %, de préférence au moins 90 %, 95 %, 98 % et 99 % d'identité après alignement optimal avec la séquence nucléique de référence. La longueur des régions d'homologie est partiellement dépendante du degré d'homologie. Ceci est 15 dû au fait qu'une diminution de la quantité d'homologie résulte dans une diminution de la fréquence de recombinaison homologue. Si des régions de non homologie existent entre les portions de séquences homologues, il est préférable que cette non homologie ne s'étale pas sur 20 toute la portion de séquence homologue mais plutôt dans des portions discrètes. Dans tous les cas, plus le degré d'homologie est faible, plus la région d'homologie doit être longue pour faciliter la recombinaison homologue. Bien que aussi peu que 14 pb homologue à 100% soient 25 suffisantes pour réaliser la recombinaison homologue dans les bactéries, dans les cellules de mammifère, des portions de séquences homologues plus longues sont préférées, en général. Ces portions font au moins 250 pb, 500 pb, 750 pb, 1 000 pb, 1500 pb, 1750 pb, 2000 pb, 2500 30 pb, 3000pb, 4000 pb de préférence au moins 5 000 pb pour chaque portion de séquence homologue. Selon l'invention, les fragments d'ADN sont de n'importe quelle taille. La taille minimale requise est subordonnée à la nécessité d'avoir au moins une région d'homologie suffisamment

longue pour faciliter la recombinaison homologue. Les fragments d'ADN ont une taille d'au moins environ 2 kb, de manière préférée d'au moins environ 3 kb, 5 kb, 6 kb.

Le transgène n'est pas limité à une séquence 5 particulière d'ADN. Ainsi les séquences d'ADN d'homologie présentes dans le transgène peuvent être d'une origine purement synthétique (par exemple réalisée en routine à partir d'un synthétiseur d'ADN), ou peuvent dériver de séquences d'ARN_m par reverse transcription, ou peuvent 10 dériver directement de séquences d'ADN génomique. Lorsque la séquence d'ADN d'homologie dérive de séquences d'ARN par reverse transcription, celle-ci peut contenir ou non tout ou partie de séquences non codantes telles les introns, selon que la molécule d'ARN correspondante a ou 15 non subi, partiellement ou totalement, un épissage. De préférence, les séquences d'ADN homologue utilisée pour réaliser la recombinaison homologue comprennent des séquences d'ADN génomique plutôt que de l'ADN_c. En effet, d'importantes séquences cis-régulatrices présentes dans 20 les introns, les régions distales, les régions promotrices peuvent être présentes. Les séquences dérivant d'ADN génomique codent généralement au moins pour une portion de gène mais peuvent alternativement coder pour des régions non transcrrites ou des régions 25 d'un locus génétique non réarrangé telles que les loci des immunoglobulines ou du récepteur des cellules T. Généralement, les séquences d'ADN génomique incluent une séquence codant pour un transcrit d'ARN. De préférence, le transcrit d'ARN code pour un polypeptide ; de 30 préférence, il s'agit de l'interféron γ et l'interleukine IL-4. Selon un mode préféré de réalisation, le transgène comprend tout ou partie du gène de l'IL-4 murin caractérisé en ce que dans l'extrémité 3' non codante du gène de l'IL-4 murin sont insérées séquentiellement une

séquence IRES, une séquence codant pour une protéine autofluorescente, une cassette de sélection positive encadrée ou non de sites-spécifiques à l'action des recombinases, par exemple une cassette Lox/Néo-TK/Lox ou 5 lox/Néo/lox ou FRT/Néo-TK/FRT ou FRT/Néo/FRT pouvant être également présente en position 5' du gène rapporteur, et caractérisé en ce que une cassette de sélection négative contenant par exemple le ou les gènes DTA et/ou TK est présente à au moins une des extrémités du transgène.

10 Lorsque la protéine spécifique de la polarisation de type Th2 est l'IL-4, alors la protéine auto-fluorescente est de préférence la RFP. Selon un autre mode de réalisation, le transgène comprend tout ou partie du gène murin de l'IFN- γ , caractérisé en ce que dans l'extrémité 3' non 15 codante du gène murin de l'IFN- γ sont insérées séquentiellement une séquence IRES, une séquence codant pour une protéine autofluorescente, une cassette de sélection positive encadrée ou non de sites-spécifiques à l'action des recombinases, par exemple une cassette 20 Lox/Néo-TK/Lox ou lox/Néo/lox ou FRT/Néo-TK/FRT ou FRT/Néo/FRT pouvant être également présente en position 5' du gène rapporteur et caractérisé en ce que une cassette de sélection négative contenant par exemple le ou les gènes DTA et/ou TK est présente à au moins une des 25 extrémités du transgène. Lorsque la protéine spécifique de la polarisation de type Th1 est l'IFN- γ , alors la protéine auto-fluorescente est de préférence la GFP.

Le transgène peut être aussi petit que quelques centaines de paires de bases d'ADN_c ou aussi large qu'une 30 centaine de milliers de paires de bases d'un locus génique comprenant la séquence codante exonique-intronique et les séquences de régulation nécessaires à l'obtention d'une expression contrôlée de manière spatio-temporelle. De préférence, le segment d'ADN recombiné a

une taille comprise entre 2,5 kb et 1 000 kb. Quoi qu'il en soit, les segments d'ADN recombinés peuvent être inférieurs à 2,5 kb et supérieurs à 1 000 kb.

Le transgène de la présente invention est de 5 préférence sous forme native, c'est-à-dire dérivé directement d'une séquence d'ADN exogène présente naturellement dans une cellule animale. Cette séquence d'ADN sous forme native peut être modifiée par exemple par insertion de sites de restriction nécessaires au 10 clonage et/ou par insertion de sites de recombinaison site-spécifiques (séquences lox et flp). Alternativement, le transgène de la présente invention peut avoir été créée artificiellement *in vitro* par les techniques de l'ADN recombinant, en associant par exemple des portions 15 d'ADN génomique et d'ADN_c. Il s'agit là de transgène chimérique. La séquence d'ADN selon l'invention, sous forme native ou chimérique, peut être mutée en utilisant les techniques bien connues de l'homme du métier. Pour 20 les séquences codantes, ces mutations peuvent affecter la séquence d'acides aminés.

Lorsque les cellules ont été transformées par le transgène, elles peuvent être cultivées *in vitro* ou bien être utilisées pour produire des animaux transgéniques. Après transformation, les cellules sont ensemencées sur 25 une couche nourricière et/ou dans un milieu approprié. Les cellules contenant la construction peuvent être détectées en utilisant un milieu sélectif. Après un temps suffisant pour laisser les colonies pousser, celles-ci sont récupérées et analysées pour déterminer si un 30 événement de recombinaison homologue et/ou une intégration de la construction s'est produite. Pour réaliser le criblage des clones ayant satisfait à la recombinaison homologue, des marqueurs positifs et négatifs, encore appelés gènes de sélection, peuvent être

insérés dans le vecteur de recombinaison homologue. Différents systèmes de sélection des cellules ayant réalisé l'événement de recombinaison homologue ont été décrits ; il convient de citer le premier système décrit 5 qui utilise des vecteurs de sélection positif/négatif (Mansour et al., 1988 ; Capecchi, 1989).

Par gène de sélection, on entend désigner un gène qui permet aux cellules qui le possèdent d'être sélectionnées spécifiquement pour ou contre la présence d'un agent 10 sélectif correspondant. Pour illustrer ce propos, un gène de résistance aux antibiotiques peut être utilisé comme un gène marqueur de sélection positif qui permet à une cellule hôte d'être sélectionnée positivement en présence de l'antibiotique correspondant. Une variété de marqueurs 15 positifs et négatifs sont connus de l'homme du métier (pour revue voir brevet US 5 627 059). Ce gène de sélection peut se trouver soit à l'intérieur ou à l'extérieur du transgène linéarisé. Lorsque le gène de sélection se trouve à l'intérieur du transgène, c'est-à- 20 dire entre les extrémités 5' et 3' du transgène, celui-ci peut être présent sous la forme d'une entité génique distincte du gène rapporteur selon l'invention. Dans ce cas, le gène de sélection est lié de manière opérationnelle avec des séquences d'ADN permettant de 25 contrôler son expression ; alternativement le gène de sélection peut être mis sous le contrôle des séquences de régulation de l'expression dudit gène rapporteur. Ces séquences, connues de l'homme du métier, correspondent notamment aux séquences promotrices, facultativement aux 30 séquences activatrices et aux signaux de terminaison de la transcription. Facultativement, le gène de sélection peut constituer un gène de fusion avec le gène rapporteur. Ledit gène de fusion est alors lié de manière opérationnelle avec des séquences d'ADN permettant de

contrôler l'expression dudit gène de fusion. Selon un autre mode de réalisation de l'invention, le gène de sélection est situé aux extrémités 5' ou 3' du transgène de sorte que si un événement de recombinaison homologue 5 se produit le gène de sélection n'est pas intégré dans l'ADN génomique cellulaire; dans ce cas le gène de sélection est un gène de sélection négatif (pour revue voir brevet US 5 627 059).

Ledit gène de sélection positive selon l'invention 10 est de préférence choisi parmi les gènes de résistance aux antibiotiques. Parmi les antibiotiques, il convient de citer de manière non exhaustive la néomycine, la tétracycline, l'ampicilline, la kanamycine, la phléomycine, la bléomycine, l'hygromycine, le 15 chloramphénicol, la carbénicilline, la généticine, la puromycine. Les gènes de résistance correspondant à ces antibiotiques sont connus de l'homme du métier; à titre d'exemple, le gène de la néomycine rend les cellules résistantes à la présence de l'antibiotique G418 dans le 20 milieu de culture. Le gène de sélection positif peut également être sélectionné parmi le gène HisD, l'agent sélectif correspondant étant l'histidinol. Le gène de sélection positif peut également être sélectionné parmi le gène de la guanine-phosphoribosyl-transférase (GpT), 25 l'agent sélectif correspondant étant la xanthine. Le gène de sélection positif peut également être sélectionné parmi le gène de l'hypoxanthine-phosphoribosyl-transférase (HPRT), l'agent sélectif correspondant étant l'hypoxanthine.

30 Ledit gène de sélection négative selon l'invention est de préférence choisi parmi le gène de la 6-thioxanthine ou thymidine kinase (TK) (Mzoz et al., 1993), les gènes codant pour des toxines bactériennes ou virales telles par exemple l'exotoxine A de *Pseudomonas*,

la toxine diphtérique (DTA), la toxine cholérique, la toxine anthrox de *Bacillus*, la toxine Pertussis, la toxine Shiga de *Shigella*, la toxine apparentée à la toxine Shiga, les toxines d'*Escherichia coli*, la colicine A, la d-endotoxine. On peut également citer le cytochrome p450 de rat et la cyclophosphophamide (Wei et al., 1994), la purine nucleoside phosphorylase d'*Escherichia coli* (*E. coli*) et la 6-methylpurine déoxyribonucléoside (Sorscher et al., 1994), les cytosines déaminases (Cdase) ou uracil phosphoribosyl transférase (UPRTase) qui peuvent être utilisées avec la 5-fluorocytosine (5-FC).

Le ou les marqueurs de sélection utilisés pour permettre d'identifier les événements de recombinaison homologue peuvent affecter par la suite l'expression génique, et peuvent être éliminés, si nécessaire, par la mise en œuvre de recombinases site-spécifiques telle la recombinase Cre spécifique des sites Lox (Sauer, 1994 ; Rajewsky et al., 1996; Sauer, 1998) ou FLP spécifique des sites FRT (Kilby et al., 1993).

Les colonies positives, c'est-à-dire contenant des cellules dans lesquelles au moins un événement de recombinaison homologue s'est produit sont identifiées par une analyse par Southern Blotting et/ou par des techniques de PCR. Le taux d'expression, dans les cellules isolées ou les cellules de l'animal transgénique selon l'invention, de l'ARNm correspondant au transgène peut également être déterminé par des techniques comprenant l'analyse par Northern blotting, l'analyse par hybridation in situ, par RT-PCR. Egalement les cellules ou tissus animaux exprimant le transgène peuvent être identifiés en utilisant un anticorps dirigé contre la protéine rapporteuse. Les cellules positives peuvent ensuite être utilisées pour réaliser les manipulations sur l'embryon et notamment l'injection des cellules

modifiées par recombinaison homologue dans les blastocystes. Pour ce qui concerne la souris, les blastocystes sont obtenus à partir de femelles superovulées de 4 à 6 semaines. Les cellules sont 5 trypsinées et les cellules modifiées sont injectées dans le blastocell d'un blastocyste. Après l'injection, les blastocystes sont introduits dans la corne utérine de femelles pseudo-gestantes. On laisse ensuite les femelles aller jusqu'à leur terme et les portées résultantes sont 10 analysées pour déterminer la présence de cellules mutantes possédant la construction. L'analyse du génotype ou d'un phénotype différent entre les cellules de l'embryon nouveau-né et les cellules du blastocyste ou des cellules ES permet de détecter les nouveau-nés 15 chimériques. Les embryons chimériques sont ensuite élevés jusqu'à l'âge adulte. Les chimères ou animaux chimériques, sont des animaux dans lesquels seule une sous-population de cellules possède un génome altéré. Les animaux chimériques présentant le gène ou les gènes 20 modifiés, sont en général croisés entre eux ou avec un animal de type sauvage afin d'obtenir une descendance hétérozygote ou homozygote. Les hétérozygotes mâles et femelles sont ensuite croisés pour générer des animaux homozygotes. A moins qu'il ne soit indiqué, l'animal 25 transgénique selon l'invention comprend des changements stables de la séquence nucléotidique des cellules de la lignée germinale.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la cellule transgénique non humaine selon l'invention peut 30 servir de cellule donneuse de noyau dans le cadre d'un transfert de noyau ou transfert nucléaire. Par transfert nucléaire, on entend désigner le transfert de noyau d'une cellule vivante donneuse de vertébré, d'un organisme adulte ou au stade fœtal, dans le cytoplasme d'une

cellule receveuse énucléée de la même espèce ou d'une espèce différente. Le noyau transféré est reprogrammé pour diriger le développement des embryons clonés qui peuvent ensuite être transférés dans des femelles 5 porteuses pour produire les fœtus et les nouveau-nés, ou utilisés pour produire des cellules de la masse cellulaire interne en culture. Différentes techniques de clonage nucléaire sont susceptibles d'être utilisées ; parmi celles-ci, il convient de citer de manière non 10 exhaustive celles qui font l'objet des demandes de brevet

WO 95 17500, WO 97 07668,
WO 97 07669, WO 98 30683, WO 99 01163, WO 99 37143.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, le ciblage génique selon la présente invention constitue 15 un « Knock-In » (K-I). Le transgène ou le gène exogène codant pour au moins une protéine rapporteuse selon l'invention est ciblée par recombinaison homologue dans le génome de l'organisme. Selon un mode préféré de réalisation, le transgène selon l'invention est dépourvu 20 d'éléments de régulation de l'expression géniques et est placé sous le contrôle des éléments endogènes de régulation de l'expression du gène codant pour la protéine spécifique d'au moins un type de polarisation de la réponse immune et/ou d'un type de fonction effectrice 25 de la réponse immune. Ainsi, selon un mode préféré de réalisation de l'invention, au moins un transgène codant pour au moins une protéine rapporteuse selon l'invention est introduit dans le génome d'une cellule animale de préférence murine sous le contrôle d'éléments de 30 régulation de l'expression du gène de l'interféron γ murin et/ou sous le contrôle des éléments de régulation de l'expression du gène de l'interleukine 4 (IL-4) murin, sans invalider l'expression de ces deux gènes endogènes.

Le transgène comprend au moins un gène, appelé gène rapporteur, qui code pour la protéine rapporteuse selon l'invention. Le gène rapporteur comprend soit l'ensemble des séquences contenant l'information pour la production 5 régulée de l'ARN correspondant (transcription) soit de la chaîne polypeptidique correspondante (transcription-traduction). Le gène rapporteur peut être un gène de type sauvage présentant un polymorphisme naturel ou pour une séquence d'ADN manipulée génétiquement, par exemple ayant 10 des délétions, substitutions ou insertions dans les régions codantes ou non codantes. De manière préférée, le ou les gènes rapporteur sont dépourvus de séquences de régulation nécessaires pour diriger et contrôler leur expression dans un ou des type(s) cellulaire(s) 15 approprié(s) ; en effet, ils sont placés après recombinaison homologue sous le contrôle des séquences animales endogènes de régulation de l'expression du gène endogène animal cible qui demeure de préférence actif suite à l'événement de recombinaison homologue et 20 l'intégration du gène rapporteur.

Alternativement, le transgène selon l'invention peut contenir des séquences de régulation appropriées pour diriger et contrôler l'expression dudit ou desdits protéines rapporteuses dans la cellule. Dans ce cas, le 25 transgène est intégré de manière aléatoire dans le génome, ou est présent sous forme épisomale dans la cellule. Dans ce cas de figure, les séquences de régulation appropriées sont des séquences inductibles par une ou plusieurs protéines d'un type spécifique d'un type 30 de polarisation de la réponse immune ou d'un type de fonction effectrice de la réponse immune, ou par une ou plusieurs protéines de la voie métabolique spécifique d'un type de polarisation de la réponse immune ou d'un type de fonction effectrice de la réponse immune.

Par éléments de régulation de l'expression du gène, on entend désigner toutes les séquences d'ADN impliquées dans la régulation de l'expression génique c'est-à-dire essentiellement les séquences régulatrices de la transcription, de l'épissage, de la traduction. Parmi les séquences d'ADN régulatrices de la transcription, il convient de citer la séquence promotrice minimale, les séquences amonts (par exemple, la boîte SP1, l'IRE pour « interferon responsive element », ...), les séquences 5 activatrices (« enhancers »), éventuellement les séquences inhibitrices (« silencers »), les séquences 10 insulateurs (« insulator »), les séquences d'épissage. 15

Ces séquences de régulation de l'expression sont liées de manière opérationnelle au(x) gène(s) rapporteur(s). Une séquence nucléique est « lié de manière opérationnelle » lorsqu'elle est placée dans une relation fonctionnelle avec une autre séquence d'acide nucléique. Par exemple, un promoteur ou un activateur (« enhancer ») est lié de manière opérationnelle à une 20 séquence codante, s'il affecte la transcription de ladite séquence codante. Concernant les séquences régulatrices de la transcription, « lié de manière opérationnelle » signifie que les séquences d'ADN liées sont contiguës, et lorsqu'il s'agit de lier deux régions codantes pour des 25 protéines, contiguës et en phase de lecture.

La cellule transgénique et/ou l'animal transgénique non humain selon l'invention est obtenu en introduisant au moins un transgène codant pour une protéine rapporteuse, dans une cellule, un zygote ou un embryon 30 précoce de l'animal non humain. L'introduction de différents transgènes dans la cellule selon l'invention peut également être réalisée de manière simultanée ou de manière décalée dans le temps. Lorsque la cellule contient plusieurs transgènes, elle peut être obtenue

directement par introduction simultanée des fragments d'ADN nécessaires à la recombinaison homologue dans ladite cellule en utilisant des méthodes favorisant la co-transformation de molécules d'ADN multiples. Les 5 cellules sont alors sélectionnées pour les multiples événements de recombinaison attendus en utilisant un système de sélection adapté. Alternativement, la cellule multi-transgénique peut être obtenue en réalisant les événements de recombinaison homologue séparément et de 10 manière décalée dans le temps. Ainsi, la cellule, après introduction d'un premier vecteur de recombinaison homologue, est sélectionnée pour le premier événement de recombinaison homologue, en utilisant un système de sélection adaptée ; cette cellule nouvellement 15 transgénique est ensuite transformée avec un second vecteur de recombinaison homologue, puis sélectionnée pour le second événement de recombinaison homologue en utilisant un système de sélection identique ou différent. Facultativement, cette cellule double transgénique peut 20 ensuite être transformée avec un troisième vecteur de recombinaison homologue, puis sélectionnée pour le troisième événement de recombinaison homologue en utilisant un système de sélection identique ou différent, et ainsi de suite. Alternativement, la cellule double, 25 triple ou multi-transgénique selon l'invention peut être obtenue par croisement successif d'animaux transgéniques. Par exemple, une cellule double transgénique peut être obtenue par croisement de deux animaux simples transgéniques homozygotes ; elle peut être obtenue par 30 croisement puis sélection de deux animaux simples transgéniques hétérozygotes, ou par croisement et sélection d'un animal simple transgénique homozygote et d'un animal simple transgénique hétérozygote.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la cellule est caractérisée en ce que ledit transgène codant pour au moins une protéine rapporteuse est intégré de manière aléatoire dans ladite cellule sans que ladite 5 intégration du transgène n' invalide l'expression d'un ou plusieurs gènes codant pour des protéines impliquées dans la polarisation de la réponse immune et/ou un type de fonction effectrice de la réponse immune, ni n'affecte le réseau biologique cellulaire ou animal. Dans ce cas, le 10 transgène est de préférence intégré dans une région non codante du génome, sous la dépendance d'éléments de réponse à des protéines impliquées dans la polarisation de la réponse immune ou dans des fonctions effectrices.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, 15 la cellule est caractérisée en ce que ledit transgène codant pour au moins une protéine rapporteuse est présent sous forme épisomale dans ladite cellule. Il est à la portée de l'homme du métier de définir la nature et les caractéristiques du vecteur d'expression utilisé pour 20 permettre le maintien et l'expression sous forme épisomale du transgène dans la cellule de l'invention.

— Au sens de la présente invention, on entend désigner par gène rapporteur, un gène qui permet aux cellules comportant ce gène d'être détectées de manière spécifique 25 suite à l'expression de ce dernier, c'est-à-dire d'être distinguées des autres cellules qui ne portent pas ce gène marqueur. Ledit gène rapporteur selon l'invention code pour une protéine rapporteuse choisie de préférence dans le groupe composé des protéines auto-fluorescentes, 30 telles que la protéine de fluorescence verte (GFP, pour « Green Fluorescence Protein »), la protéine de fluorescence verte augmentée (EGFP), la protéine de fluorescence jaune (YFP), la protéine de fluorescence bleue (BFP), la protéine de fluorescence rouge (RFP),

ainsi que les variants de ces protéines de fluorescence obtenues par mutagenèse pour générer une fluorescence de couleur différente. Ledit gène « reporter » code également pour toute enzyme détectable de manière 5 fluorescente, phosphorescente, ou visible par un procédé histochimique sur des cellules vivantes ou toutes autres méthodes d'analyse cellulaire, ou par microscopie. De façon non exhaustive, il convient de citer la β -galactosidase (β -GAL), la β -glucuronidase (β -GUS), la 10 phosphatase alcaline, notamment la phosphatase alcaline placentaire (PLAP), la déshydrogénase alcoolique, notamment la déshydrogénase alcoolique de drosophile (ADH), la luciférase, notamment la « *Firefly Luciferase* », la chloramphénicol-acétyl-transférase 15 (CAT), l'hormone de croissance (GH).

La présente invention porte également sur l'animal transgénique non-humain comprenant au moins une cellule selon l'invention. Par « animal transgénique », on entend désigner un animal non humain, de préférence un mammifère 20 choisi dans le groupe des rongeurs et notamment de la souris, du rat, du hamster, du cobaye. La souris est particulièrement appréciée car son système immunitaire a été étudié en profondeur. Alternativement, l'animal transgénique est choisi parmi les animaux d'élevage et 25 notamment les porcins, ovins, caprins, bovins, équidés, notamment le cheval, les lagomorphes, notamment le lapin. L'animal transgénique selon l'invention peut également être choisi parmi les primates, notamment les singes, tels le macaque, le chimpanzé, le babouin.

30 Compte tenu des polymorphismes génétiques présents dans la population, il peut être intéressant pour analyser ou obtenir une réponse physiologique ou comportementale caractéristique que les animaux transgéniques selon l'invention, et notamment les souris

transgéniques selon l'invention présentent des fonds génétiques différents. Ainsi, les souris selon l'invention peuvent être sélectionnées dans les lignées murines consanguines (« inbred ») 129Sv, 129Ola, C57Bl6, 5 BalB/C, DBA/2, mais également dans les lignées non consanguines (« outbred »), ou des lignées hybrides.

L'animal transgénique selon l'invention comprend au moins une cellule dont le génome comprend au moins transgène selon l'invention, présent soit sous forme 10 d'élément extra-chromosomal, soit intégrée de manière stable dans l'ADN chromosomique. De préférence, l'ensemble des cellules de l'animal et notamment ses cellules de la lignée germinale sont transgéniques.

Selon un mode préféré de réalisation, l'invention 15 concerne un animal transgénique non-humain caractérisé en ce qu'il comprend au moins une cellule exprimant (i) un premier transgène codant pour une première protéine rapporteuse, ledit premier transgène étant intégré par recombinaison homologue (« Knock-In ») au niveau d'un 20 gène endogène codant pour une protéine spécifique du type Th1 de polarisation de la réponse immune sans invalider l'expression dudit gène endogène, l'expression dudit premier transgène étant corrélée avec l'expression dudit gène endogène ; et (ii) un second transgène codant pour 25 une deuxième protéine rapporteuse, distincte de ladite première protéine rapporteuse, ledit second transgène étant intégré par recombinaison homologue (« Knock-In ») au niveau d'un gène endogène codant pour une protéine spécifique du type Th2 de polarisation de la réponse 30 immune, sans invalider l'expression dudit gène endogène, l'expression dudit second transgène étant corrélée avec l'expression dudit gène animal endogène. De manière encore préférée, cet transgénique non-humain se caractérise en ce que la protéine spécifique du type Th1

de polarisation de la réponse immune est l'IFN- γ , la protéine spécifique de la polarisation de type Th2 est l'interleukine 4 (IL-4), le dit premier transgène code pour la protéine rapporteuse GFP et le second transgène 5 code pour la protéine rapporteuse RFP.

C'est également un des objets de l'invention de fournir un procédé *in vitro* pour caractériser le type de polarisation de la réponse immune induite par un immunogène, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes 10 de (a) mise en contact dudit immunogène avec une cellule selon l'invention; (b) détermination si une expression ou des expressions de transgène(s) codant pour au moins une protéine rapporteuse dont l'expression est associée à un type de polarisation de la réponse immune, ou un type de 15 fonction effectrice, se produit (respectivement « se produisent ») ; (c) facultativement, évaluation quantitative de l'expression du ou des protéine(s) rapporteuse(s); et enfin (d) caractérisation qualitative, facultativement quantitative, du ou des 20 type(s) de polarisation de la réponse immune.

L'invention concerne également le procédé *in vivo* pour caractériser le type de réponse immune induite par un immunogène, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de (a) mise en contact dudit immunogène avec un 25 animal selon l'invention; (b) détermination si une expression ou des expressions de transgène(s) codant pour au moins une protéine rapporteuse dont l'expression est associée à un type de réponse immune se produit (respectivement « se produisent ») dans au moins une 30 cellule dudit animal ; (c) facultativement, évaluation quantitative de l'expression du ou des protéine(s) rapporteuse(s); et enfin (d) caractérisation qualitative, facultativement quantitative, du ou des types de polarisation de la réponse immune.

C'est également un des objets de la présente invention de fournir un procédé d'obtention de cellules animales non humaines spécifiques d'un type de polarisation de la réponse immune et/ou d'une fonction effectrice de la réponse immune, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de (a) mise en contact d'un immunogène ou d'un agent pathogène induisant la mise en place d'une réponse immune et/ou d'une fonction effectrice de la réponse immune avec une cellule selon 5 l'invention; (b) détermination si une expression du transgène codant pour au moins une protéine rapporteuse, dont l'expression est associée au dit type de polarisation de la réponse immune et/ou au dit type de fonction effectrice de la réponse immune, se produit; et 10 15 enfin (c) identification des cellules exprimant ladite protéine rapporteuse.

C'est également un des objets de l'invention de fournir un procédé d'obtention de cellules animales non humaines spécifiques d'un type de réponse immune et/ou 20 d'une fonction effectrice de la réponse immune, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de (a) mise en contact d'un immunogène ou d'un agent pathogène induisant la mise en place d'une réponse immune et/ou d'une fonction effectrice de la réponse immune avec un animal selon l'invention; (b) de détermination si une 25 expression du transgène codant pour au moins une protéine rapporteuse associée audit type de réponse immune et/ou à une fonction effectrice de la réponse immune se produit dans au moins une cellule dudit animal; (c) 30 d'isolement de tout ou partie des cellules de l'animal; et enfin (d) d'identification parmi les cellules du dit l'animal des cellules exprimant ladite protéine rapporteuse. De préférence, les cellules sont identifiées et/ou caractérisées en utilisant un trieur de cellules

(cytometrie de flux) mais tous autres moyens manuels ou automatiques de tri peuvent être employés.

Selon un mode préféré de réalisation, l'immunogène spécifique d'un type de réponse immune a été caractérisé 5 par un procédé selon l'invention tel que précédemment décrit. Par immunogène au sens de la présente invention, on entend désigner un composé capable de déclencher une réponse immune. Parmi les immunogènes on peut citer les antigènes, qui réagissent avec les récepteurs des 10 cellules T et B, ou avec des anticorps préformés, ou avec tout autre types de récepteur exprimés sur les cellules impliquées dans la mise en place et le développement d'une réponse immune innée ou spécifique. Parmi les immunogènes il convient de citer les antigènes 15 classiquement utilisés par l'homme de l'art, les allergènes, les mitogènes, les agents pathogènes, ou l'un de leurs constituants, d'origine virale, bactérienne, parasitaire, fongique, mycoplasmique, les vaccins et compositions vaccinales, les adjuvants, les médicaments, 20 les composés ou agents chimiques. La mise en contact d'un immunogène spécifique avec une cellule ou un animal selon l'invention peut se faire par diverses voies telles par exemple une infection classique par un microorganisme pathogène, ou via un vecteur biologique de délivrance 25 (moustique, tique, bactérie, virus et parasites ou agent commensale recombinant, ADN nu...), par inhalation, en aérosol, par la nourriture. Expérimentalement, l'immunogène peut être mis en contact avec l'animal par une administration par voie systémique, en particulier 30 par voie intraveineuse, par voie intramusculaire, intradermique, contact cutané ou par voie orale.

C'est également un objet de l'invention de fournir un procédé de criblage de composés modulant au moins un type de polarisation de la réponse immune et/ou au moins une

fonction effectrice de la réponse immune caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de (a) mise en contact d'une cellule et/ou d'un animal selon l'invention avec un immunogène responsable du déclenchement d'une réponse 5 immune, de préférence spécifique d'un type de polarisation, et/ou d'une fonction effectrice, et de manière simultanée ou décalée dans le temps avec ledit composé ; (b) la mise en contact d'une cellule et/ou un animal selon l'invention avec ledit immunogène de l'étape 10 (a) ; (c) la détermination qualitative, facultativement quantitative, de l'expression d'au moins un transgène codant pour une protéine rapporteuse dont l'expression est corrélée à un type spécifique de polarisation et/ou d'une fonction effectrice puis comparaison desdites 15 expressions déclenchées en a) et b) ; puis (d) l'identification du composé qui module sélectivement la réponse immune et/ou une fonction effectrice. Selon un mode préféré de réalisation, la dite polarisation de la réponse immune est de type Th1. Selon un autre mode 20 préféré de réalisation, la dite polarisation de la réponse immune est de type Th2. Selon un mode préféré de réalisation, la dite fonction effectrice peut être de manière non exhaustive une activité CTL, une fonction cytotoxique autre, une fonction phagocytaire, une 25 activité humorale, une fonction immunosuppressive.

Enfin, l'invention porte également sur l'utilisation d'une composition comprenant un composé modulant la réponse immune, de préférence spécifique d'un type de polarisation, et/ou d'un type de fonction effectrice et 30 un véhicule pharmaceutiquement acceptable à titre de médicament pour le traitement préventif et/ou curatif d'un homme ou d'un animal nécessitant un tel traitement, caractérisé en ce que l'aptitude dudit composé à inhiber ou activer sélectivement la réponse immune spécifique

d'un type de polarisation et/ou d'un type de fonction effectrice est déterminée par (a) la mise en contact d'une cellule et/ou d'un animal selon l'invention avec un immunogène responsable du déclenchement d'une réponse 5 immune, de préférence spécifique d'un type de polarisation et/ou d'une fonction effectrice, et de manière simultanée ou décalée dans le temps avec ledit composé ; (b) la mise en contact d'une cellule et/ou d'un animal selon l'invention avec un immunogène responsable 10 du déclenchement d'une réponse immune, de préférence spécifique d'un type de polarisation et/ou d'une fonction effectrice ; (c) la détermination qualitative, facultativement quantitative de l'expression d'au moins un transgène codant pour une protéine rapporteuse dont 15 l'expression est corrélée à un type spécifique de polarisation et/ou d'une fonction effectrice puis comparaison desdites expressions déclenchées en a) et b) ; puis (d) l'identification du composé qui module 20 sélectivement la réponse immune spécifique d'un type de polarisation et/ou d'une fonction effectrice. De préférence la dite réponse immune est de type Th1. La composition selon l'invention peut être utilisée dans un traitement préventif ou curatif d'un certain nombre de pathologies pour lesquelles un dysfonctionnement d'un 25 type de polarisation de la réponse immune, notamment Th1, a été observé. Parmi ces pathologies, il convient de citer le rejet des allo-greffes, la sclérose en plaque, les maladies inflammatoires et chroniques de l'intestin (MICI) et/ou rectocoliques, la maladie de Crohn, la 30 sarcoidite, l'ulcère peptidique induit par helicobacter pylori, l'arthrite rhumatoïde, l'arthrite réactive, notamment la maladie de Lyme.

Selon un autre mode préféré, la dite réponse immune est de type Th2 et le dit traitement est destiné à

traiter une pathologie choisie dans le groupe composé de la tolérance aux allo-greffes, le passage de l'infection VIH au SIDA déclaré, le syndrome d'Omenn, les maladies atopiques (allergies médiées par les IgE), telles que les 5 réactions d'hypersensibilité immédiate et/ou inflammatoire notamment l'anaphylaxie systémique, l'anaphylaxie cutanée, l'asthme, l'eczéma, la dermatite atopique, notamment le psoriasis, les maladies inflammatoires et chroniques de l'intestin (MICI) et/ou 10 rectocoliques, les maladies parasitaires dans lesquelles une réponse IgE est connue comme étant protectrice, notamment les maladies parasitaires helminthiques (infections par *Schistosoma mansoni* et *Nippostrongylus filiaires*), la sclérose systémique progressive, la 15 péridontite chronique, la progression tumorale. Par véhicule pharmaceutiquement acceptable, on entend désigner tout type de véhicule employé habituellement dans la préparation de compositions pharmaceutiques et vaccinales, c'est-à-dire un diluant, vecteur synthétique 20 ou biologique, un agent de suspension telle une solution saline isotonique ou tamponnée. De préférence, ces composés seront administrés par voie systémique, en particulier par voie intraveineuse, par voie intramusculaire, intradermique ou par voie orale. Leurs 25 modes d'administration, posologies et formes galéniques optimaux peuvent être déterminés selon les critères généralement pris en compte dans l'établissement d'un traitement adapté à un patient comme par exemple l'âge ou le poids corporel du patient, la gravité de son état 30 général, la tolérance au traitement et les effets secondaires constatés, etc. Quand l'agent est un polypeptide, un antagoniste, un ligand, un polynucléotide, par exemple une composition antisens, un vecteur, par exemple un vecteur antisens, on peut

l'introduire dans des tissus ou des cellules hôtes par un certain nombre de façons, incluant l'infection virale, la micro-injection ou la fusion de vésicules. On peut également utiliser l'injection par jet pour une 5 administration intramusculaire.

Enfin, l'invention concerne l'utilisation d'une cellule ou d'un animal selon l'invention à des fins de recherches expérimentales pour l'analyse et l'étude des mécanismes moléculaires, biologiques, biochimiques, 10 physiologiques et/ou physiopathologiques d'au moins un type de polarisation de la réponse immune et/ou d'un type de fonction effectrice de la réponse immune. En fonction du type de recherche que l'on veut développer, on utilise soit l'animal entier, soit des cellules dérivées dudit 15 animal. Ces cellules peuvent être soit isolées fraîchement de l'animal ou peuvent être immortalisées en culture, soit en multipliant les passages, soit en transformant les cellules par des virus tels le virus SV40 ou le virus d'Epstein-Bahr.

20 D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaissent dans la suite de la description avec les exemples représentés ci-après. Dans ces exemples on se référera aux figures suivantes :

25 **FIGURE 1 : Représentation schématique du transgène codant pour la protéine autofluorescente RFP destinée au « Knock-In » dans l'extrémité 3' non codante du gène de l'IL-4.**

En haut : représentation schématique de l'extrémité 3' du 30 gène de l'IL-4. En hachuré est représentée la région génique transcrive. En pointillés est représentée la région aval au gène de l'IL-4 qui contient des séquences régulatrices. Le site d'arrêt de la traduction est indiqué par un « STOP ».

En bas : représentation schématique du transgène.

IRES : site interne d'entrée des ribosomes du virus de l'encéphalomyocarditis

5 RFP : protéine de fluorescence rouge

Lox : site d'action de la recombinase Cre

Néo : gène de résistance à la Néomycine sous la dépendance d'un promoteur eucaryote

TK : gène de la thymidine kinase.

10 DTA : gène de la toxine diphtérique A.

FIGURE 2 : Représentation schématique du transgène codant pour la protéine autofluorescente GFP destinée au « Knock-In » dans l'extrémité 3' non codante du gène de l'IFN- γ .

En haut : représentation schématique de l'extrémité 3' du gène de l'IFN- γ . En hachuré est représentée la région génique transcrive. En pointillés est représentée la région aval au gène de l'IL- γ qui contient des séquences régulatrices. Le site d'arrêt de la traduction est indiqué par un « STOP ».

En bas : représentation schématique du transgène.

IRES : site interne d'entrée des ribosomes du virus de l'encéphalomyocarditis

25 RFP : protéine de fluorescence rouge

Lox : site d'action de la recombinase Cre

Néo : gène de résistance à la Néomycine sous la dépendance d'un promoteur eucaryote

30 TK : gène de la thymidine kinase sous la dépendance d'un promoteur eucaryote

DTA : gène de la toxine diphtérique A.

EXEMPLESEXEMPLE 1 : MATERIEL ET METHODES5 1.1. Gènes endogènes cibles1.1.1. Interleukine 4

L'interleukine 4 (IL-4) est une protéine majoritairement sécrétée par exemple par les mastocytes activés (Bradding et al., 1992) et les cellules T, (Mossmann et al., 1986). L'IL4 joue un rôle important dans la différenciation des cellules T naïves CD4+ murines en cellules effectrices de la réponse Th2 (Mossmann et al. 1986, Swain et al., 1990 ; Gross et al., 1993 ; Kopf et al., 1993).

Le gène murin codant pour l'interleukine 4 est localisé sur le chromosome 7 du génome de la souris où il est organisé en 4 exons et 3 introns avec des séquences promotrices identifiées à l'extrémité 5' entre les positions - 760 et - 1 (Otsuka et al., 1987). Le mécanisme de l'expression de l'interleukine 4 implique un certain nombre de facteurs de transcription qui incluent GATA-3, C-MAF, NFAT, NIP-45 et JUN B (Li-Weber et al., 1997).

Un certain nombre de modèles de souris déficientes en IL-4 ont été générées (Kuhn et al., 1991 ; Kopf et al., 1993 ; Noben-Trauth et al., 1996 ; Metwali et al., 1996 1996 ; Hu-Li J. et al. 2001). Il semble que le phénotype de souris adulte, homozygote nulle (« knock-out ») pour le gène de l'interleukine 4, présente des taux d'IgG1 et d'IgE réduits avec un développement normal des cellules B et T et des réponses Th2 altérées. Les hétérozygotes

présentent, quant à elles, des réponses ayant un phénotype intermédiaire.

Un fragment d'ADNc de 585 paires de bases codant pour l'IL-4 de souris a été isolé à partir d'une banque d'ADNc obtenue à partir de cellules T helper. Ce fragment d'ADNc code pour une protéine de 140 aminoacides (Lee et al., 1986) qui, après glycosylation, a une masse moléculaire de 20 kDa (Sideras et al., 1987).

10 1.1.2. Interféron γ

Un ADNc de 1292 pb codant pour l'IFN- γ de souris a été identifié par homology avec l'IFN- γ humain par criblage d'une librairie de phage λ de souris (Gray et al., 1983). Il code pour une protéine de 15-kDa, sécrétée exclusivement sous la forme d'un homodimère non covalent. Les cellules T (majorité des CD8 $^{+}$, CD4 $^{+}$ Th0 et Th1) et les macrophages sont la source principale d'IFN- γ . L'IFN- γ est souvent désigné comme une cytokine inflammatoire du fait de sa propriété d'activer les macrophages en augmentant l'expression de molécules de surface de classe II du MHC, et en induisant la libération de cytokine pro-inflammatoires (Farrar et al., 1993). Le gène codant pour l'IFN- γ de souris a été localisé sur le chromosome 10. Il est organisé en 4 exons et 3 introns précédés par une région promoteur de 4 kb en 5' (Gray et al., 1983). Un nouveau facteur de transcription appelé T-bet a été récemment identifié comme responsable de l'induction de la réponse Th1 par l'intermédiaire de la production d'IFN- γ (Szabo et al., 2000). Les souris homozygotes déficientes pour l'IFN- γ se développent normalement et sont en bonne santé en l'absence de pathogène. Elles présentent une

susceptibilité augmentée aux infections microbactériennes dues à des fonctions altérées des macrophages (Dalton et al., 1993). Les animaux hétérozygotes présentent un phénotype plus modéré.

5

1.2. Gènes rapporteurs

Le marquage intracellulaire par des anticorps monoclonaux spécifiques est une méthode communément utilisée pour la détection des cytokines dans un type cellulaire donné. Cependant, les protocoles actuels nécessitent des procédures longues qui comprennent une étape de culture *in vitro* accompagnée d'une restimulation, suivie de la fixation des cellules et de leur perméabilisation, et entraînent la mort cellulaire des cellules étudiées. En revanche, le suivi d'un marqueur fluorescent associé à la production de la cytokine ciblée permettrait l'identification quasi instantanée des cellules productrices avec un minimum de manipulation et l'isolation et la collecte de cellules productrices de façon viable (en utilisant le triage par cytométrie en flux par exemple).

De nombreux mutants ont été dérivés de la forme native de la Green Fluorescent Protein (GFP) de la méduse *Aequoria victoria* et sont commercialisés par différent fournisseurs. Les deux gènes rapporteurs seront choisis de façon à donner l'expression de protéines à forte intensité de fluorescence détectable par cytométrie en flux de façon simultanée à deux longueurs d'ondes distinctes. Le mutant donnant la plus forte intensité de fluorescence sera associé à l'IL-4 produite en quantité moindre par rapport à l'IFN- γ .

L'expression des protéines autofluorescentes à partir des transgènes ne semble pas induire de toxicité significative ou une altération de la réponse immunitaire. Les souris transgéniques de l'art antérieur exprimant la GFP ou un mutant de GFP semblent se développer normalement. Les protéines autofluorescentes selon l'invention sont majoritairement séquestrées à l'intérieur de la cellule.

De préférence, les gènes rapporteurs choisis sont la GFP et la RFP. En effet, ce couple de permet une détection par la majorité des cytomètres de flux disponibles dans le commerce. L'expression de la protéine RFP est de préférence associée à la protéine IL-4 et celle de la GFP avec l'interféron γ .

15

1.3. Le vecteur de recombinaison homologue

Un vecteur contenant le gène codant pour la protéine fluorescente choisie sera transfété dans des cellules embryonnaires de souris choisies dans un fond génétique approprié afin que s'effectue une recombinaison homologue du vecteur dans le locus de la cytokine ciblée.

Il a été démontré que le site d'entrée interne du ribosome (IRES pour *Internal ribosome entry site*) du virus de l'encéphalite du myocarde (EMCV pour *Encephalomyocarditis virus*) permettait la transduction simultanée à partir d'un seul transcrit d'ARNm, de deux gènes rapporteurs placés sous le contrôle d'un même promoteur (Mountford et al., 1995; Zhu et al., 1999; Liu et al., 2000). Ce modèle a été utilisé récemment pour obtenir dans les cellules T activées de souris, une relation linéaire entre l'expression de l'IL-4 et celle du gène de la GFP introduit par infection rétrovirale (Costa et al., 2000). Dans le système proposé par les

inventeurs, un vecteur contenant le gène rapporteur sous l'influence d'une séquence IRES sera introduit par knock-in à la suite ou dans le locus du gène de la cytokine ciblée. Afin de perturber au minimum les mécanismes naturels de la sécrétion des cytokines ciblées, les constructions IRES-gène rapporteur devront être introduit dans une portion du gène ne comportant pas de séquences régulatrices connues. Des marqueurs de sélection positive (tel que le gène de résistance à la néomycine) et 10 négative (tel que DTA ou tk) seront également introduit dans le vecteur afin de sélectionner les cellules embryonnaires ayant effectuées la recombinaison homologue. Des séquences Lox seront ajoutées pour permettre l'excision des marqueurs de sélection par 15 l'action de la Cre, ceci afin d'obtenir un animal transgénique dépourvu des gènes de sélections.

1.4. Souris transgéniques

20 Des souris transgéniques exprimant l'un ou l'autre des gènes rapporteurs (l'un associé à l'IFN- γ , l'autre associé à l'IL-4) seront produites de façon indépendantes. Les homozygotes pour chaque type de transgénique seront ensuite croisés et la descendance 25 sera testée afin de sélectionner les animaux exprimant les deux transgéniques.

Le fond génétique des animaux transgéniques pourra également être changé par croisements successifs avec des animaux d'un autre fond génétique que celui utilisé 30 initialement.

REFERENCES

Bradding et al. (1992) J. Exp. Med. 176 : 1381.

Capecci (1989) Science 244 : 1288.

5 Costa et al. (2000) J. Immunol. 164 : 3581.

Dalton et al. (1993) Science 259 : 1739.

Del Prete et al. (1991) J. Clin. Invest. 88 : 346

Farrar (1993) Annu. Rev. Immunol. 11 : 571.

Firestein et al. (1989) J. Imm. 143 : 518.

10 Gordon et al. (1989) Transgenic Animals, Intl. Rev. Cytol. 115 : 171.

Gray (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 : 5842.

Gross et Paul (1993) J. Immunol. 150 : 2112.

Groux et al. (1997) Nature 339 : 152.

15 Hu-Li J. et al. (2001) Immunity 14 : 1-11.

Keon et al. (1990) Methods and Enzymology 185 : 527.

Kilby et al. (1993) TIG 9 : 413.

Kopf et al. (1993) Nature 362 : 245.

Kuhn et Muller (1991) Science 254 : 707.

20 Lavitrano et al. (1989) Cell 57 : 717.

Lee et al. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 : 2061.

Li-Weber et al. (1997) Immunobiology 198 : 170.

Liu et al. (2000) Anal. Biochem. 280 : 20.

Lo (1983) Mol. Cell. Biol. 3 : 1803

25 Mansour et al. (1989) Ann. Res. Genet. 23 : 199.

Metwali et al. (1996) J. Immunol. 157 : 4546.

Mosmann et al. (1986) J. Immunol. 136 : 2348.

Mosmann et al. (1989) Ann. Rev. Immunol. 7 : 145.

Mosmann (1996) Immunol. Today 17 : 138.

30 Mountford (1995) Trends In Genetics 11 : 179.

Mzoz et al. (1993) Human Gene Ther. 4 : 589.

Neddeleman et al. (1970) J. Mol. Biol. 48 : 443

Noben-Trauth et al. (1996) Transgenic Res. 5 : 487.

Otsuka et al. (1987) Nucleic Acids Res. 15 : 333.

Ouyang et al. (2000) Immunity 12 :27.

Pearson et al. (1988) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85: 2444.

Ranganath et al. (1998) J. Immunol. 161 : 3822.

5 Robinson et al. (1993) J. Imm. 143 :518.

Romagnani (1999) Inflamm. Bowel Dis. 5 :285.

Sambrook et al. (1989) Molecular cloning : a laboratory manual second edition - Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY. USA

10 Sauer (1994) Current opinion in Biotechnology 5 : 521.

Sauer B. (1998) Methods 14 : 381-392.

Sideras et al. (1987) Adv. Exp. Med. Biol. 213 :227.

Smith et Waterman (1981) Ad. App. Math. 2 : 482

Sorscher et al. (1994) Gene Therapy 1 : 223-238.

15 Swain et al. (1990) J. Immunol. 145 : 3796.

Szabo et al. (2000) Cell 100 : 655.

Thompson et al. (1989) Cell 56 : 313.

Van der putten et al. (1985) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82 : 6148.

20 Wei et al. (1994) Human Gene Ther. 5 : 969-978.

Wiernenga et al. (1990) J. Imm. 144 :4651.

Yamamura et al. (1991) Science 254 :77.

Zheng (1997) Cell 89 : 587.

Zhu et Grace (1999) Cytometry 37 : 51.

REVENDICATIONS

1. Cellule animale transgénique non humaine exprimant au moins un transgène intégré de manière stable dans le génome de ladite cellule, et codant pour au moins une protéine rapporteuse caractérisée en ce que :
 - l'expression de ladite protéine rapporteuse est corrélée à l'expression d'au moins une protéine naturellement produite par ladite cellule et spécifique d'un type de polarisation de la réponse immune et/ou d'une fonction effectrice de la réponse immune,
 - l'expression du dit transgène est contrôlée par les éléments de régulation du gène animal endogène codant pour la dite protéine naturellement produite et spécifique d'un type de polarisation de la réponse immune et/ou d'une fonction effectrice de la réponse immune .
2. Cellule selon la revendication 1 caractérisée en ce que ledit transgène, ou son expression, n'affecte pas le réseau biologique de la dite cellule.
3. Cellule selon les revendications 1 et 2 caractérisée en ce que à chaque type de polarisation de la réponse immune correspond une protéine rapporteuse distincte.
4. Cellule selon les revendications 1 et 2 caractérisée en ce que à chaque type de fonction effectrice de la réponse immune correspond une protéine rapporteuse distincte.
5. Cellule selon les revendications 1 à 4, caractérisée en ce que le type de polarisation de la

réponse immune est choisi parmi le type T helper (T auxiliaire), T répresseur, T cytotoxique, le type NK, le type K et le type humoral.

5 6. Cellule selon la revendications 5, caractérisée en ce que le type T helper est choisi parmi le type Th0, Th1, Th2, Th3, Tr1.

7. Cellule selon la revendications 6, caractérisée 10 en ce que le type T helper est choisi parmi le type Th1 et Th2.

8. Cellule selon la revendication 7, caractérisée en ce que ladite cellule exprime deux transgènes codant 15 chacun pour une protéine rapporteuse distincte, l'expression de chaque protéine rapporteuse étant spécifique du type Th1 ou Th2 de polarisation de la réponse immune.

20 9. Cellule selon les revendications 1, 2 et 4, caractérisée en ce que le type de fonction effectrice de la réponse immune est choisi parmi les activités ou fonctions CTL, les activités ou fonctions phagocytaires, les activités ou fonctions cytotoxiques, les activités ou 25 fonctions immunosuppressives, les activités ou fonctions de présentation d'antigènes, les fonction d'activation cellulaire.

10. Cellule selon les revendications 1 à 9, 30 caractérisée en ce que l'intégration dudit transgène est réalisée par recombinaison homologue (« Knock-In ») au niveau dudit gène animal endogène codant pour ladite protéine spécifique d'un type de polarisation de la réponse immune et/ou d'une fonction effectrice de la

réponse immune, sans invalider l'expression dudit gène animal endogène.

11. Cellule selon la revendication 10, caractérisée en ce que l'intégration dudit transgène est réalisée en amont, en aval ou au milieu du gène codant pour ladite protéine spécifique d'un type de polarisation de la réponse immune et/ou d'une fonction effectrice de la réponse immune.

10

12. Cellule selon la revendication 11, caractérisée en ce que ledit transgène comprend une séquence de reprise de la traduction, ladite séquence étant située entre la séquence codante de ladite protéine rapporteuse et de la séquence codante de ladite protéine spécifique d'un type de polarisation de la réponse immune et/ou d'une fonction effectrice de la réponse immune.

13. Cellule selon les revendications 1 à 9, caractérisée en ce que l'intégration dudit transgène est réalisée de manière aléatoire sans que ladite intégration n'affecte le réseau biologique de l'animal ni n'invalide l'expression desdits gènes codant pour les protéines spécifiques d'un type de polarisation de la réponse immune, ou d'un type de fonction effectrice.

14. Cellule animale transgénique non-humaine caractérisée en ce qu'elle exprime :

a) un premier transgène codant pour une première protéine rapporteuse, ledit premier transgène étant intégré par recombinaison homologue (« Knock-In ») au niveau d'un gène animal endogène codant pour une protéine spécifique du type Th1 de polarisation de la réponse immune sans invalider l'expression dudit gène endogène,

l'expression dudit premier transgène étant corrélée avec l'expression dudit gène animal endogène ; et/ou

b) un second transgène codant pour une deuxième protéine rapporteuse, distincte de ladite première 5 protéine rapporteuse, ledit second transgène étant intégré par recombinaison homologue (« Knock-In ») au niveau d'un gène endogène codant pour une protéine spécifique du type Th2 de polarisation de la réponse immune, sans invalider l'expression dudit gène endogène, 10 l'expression dudit second transgène étant corrélée avec l'expression dudit gène animal endogène.

15. Cellule selon les revendications 1 à 14 caractérisé en ce que ladite protéine rapporteuse est 15 sélectionnée dans le groupe composé des protéines autofluorescentes et des enzymes détectables par un procédé histochimique.

16. Cellule selon la revendication 15 caractérisé 20 en ce que ladite protéine autofluorescente est choisie dans le groupe composé de la protéine de fluorescence verte (GFP), la protéine de fluorescence verte augmentée (EGFP), la protéine de fluorescence rouge (RFP), la protéine de fluorescence bleue (BFP), la protéine de 25 fluorescence jaune (YFP), et les variants fluorescents de ces protéines.

17. Cellule selon la revendication 15, caractérisé en ce que ladite enzyme est choisie dans le groupe 30 composé de la β -galactosidase, de la β -glucuronidase, de la phosphatase alcaline, de la déshydrogénase alcoolique, de la luciférase, de la chloramphénicol-acétyl-transférase, de l'hormone de croissance.

18. Cellule selon les revendications 1 à 17, caractérisée en ce que ladite protéine spécifique de la polarisation de type Th1 est choisie dans le groupe composé de l'interleukine 2 (IL-2), l'interleukine 12 5 (IL-12), l'interleukine 18 (IL-18), l'interféron- γ , le TNF- β , le TNF- α , T-bet, STAT-4, la chaîne β du récepteur de l'interféron γ (IFN- γ), les chaînes du récepteur à l'IL-12 et à l'IL-18, RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , CD26, la chaîne β 2 du récepteur de l'interleukine 12 (IL-12R β 2) 10 CCR5, CCR2, CXCR3.

19. Cellule selon la revendication 18, caractérisée en ce que la protéine spécifique de la polarisation de type Th1 est l'IFN- γ .

15

20. Cellule selon la revendication 19, caractérisée en ce que ladite protéine spécifique de la polarisation de type Th1 est l'IFN- γ et la protéine rapporteuse est la GFP.

20

21. Cellule selon l'une quelconque des revendications 1 à 17, caractérisée en ce que ladite protéine spécifique de la polarisation de type Th2 est choisie dans le groupe composé de l'interleukine 3 (IL-3), l'interleukine 4 (IL-4), l'interleukine 5 (IL-5), l'interleukine 10 (IL-10), l'interleukine 13 (IL-13), GATA-3, STAT-6, c-maf, NFAT, NIP45, CD30, CD26L, ST2L, CCR3, CCR4, CCR8, CXCR4, CRTH2, STIF.

30

22. Cellule selon la revendication 21, caractérisée en ce que ladite protéine spécifique de la polarisation de type Th2 est l'interleukine 4 (IL-4).

23. Cellule selon la revendication 22, caractérisée en ce que ladite protéine spécifique de la polarisation de type Th2 est l'IL-4 et la protéine rapporteuse est la RFP.

5

24. Cellule selon l'une des revendications 1 à 23 choisie dans le groupe composé des cellules de souris, de rat, de hamster, de cobaye, de lapin, de primates, des ovins, des caprins, des porcins, des bovins, du cheval.

10

25. Cellule de souris selon la revendication 24.

26. Cellule selon les revendications 1 à 25, caractérisée en ce que ladite cellule est choisie parmi 15 les cellules du système immunitaire, les cellules neuronales, les cellules souches embryonnaires, les cellules souches hématopoïétiques, les cellules souches neuronales.

20

27. Cellule selon la revendication 26, caractérisée en ce que ladite cellule du système immunitaire est choisie parmi les lymphocytes T, les cellules NK, les cellules K, les lymphocytes B, les mastocytes, les macrophages, les monocytes, les neutrophiles, les 25 éosinophiles, les basophiles, les plaquettes, les monocytes des cellules dendritiques, les cellules de Langerhans.

28. Cellule souche selon la revendication 26, 30 caractérisée en ce que ladite cellule souche est subséquemment différenciée en une cellule choisie parmi les cellules du système immunitaire selon la revendication 27 et les cellules neuronales.

29. Animal transgénique, non-humain, comprenant au moins une cellule selon les revendications 1 à 28.

30. Animal selon la revendication 29, caractérisé en ce qu'il est choisi dans le groupe composé de la souris, du rat, du hamster, du cobaye, des lagomorphes, des primates, des ovins, des caprins, des porcins, des bovins, des équidés.

10 31. Animal selon la revendication 30, caractérisé en ce que l'animal est une souris.

32. Animal transgénique non-humain selon la revendication 31 caractérisée en ce qu'il comprend au moins une cellule exprimant :

a) un premier transgène codant pour une première protéine rapporteuse, ledit premier transgène étant intégré par recombinaison homologue (« Knock-In ») au niveau d'un gène endogène codant pour une protéine spécifique du type Th1 de polarisation de la réponse immune sans invalider l'expression dudit gène endogène, l'expression dudit premier transgène étant corrélée avec l'expression dudit gène animal endogène ; et

b) un second transgène codant pour une deuxième protéine rapporteuse, distincte de ladite première protéine rapporteuse, ledit second transgène étant intégré par recombinaison homologue (« Knock-In ») au niveau d'un gène endogène codant pour une protéine spécifique du type Th2 de polarisation de la réponse immune, sans invalider l'expression dudit gène endogène, l'expression dudit second transgène étant corrélée avec l'expression dudit gène endogène.

33. Animal transgénique non-humain selon la revendication 32 caractérisée en ce que la dite protéine spécifique du type Th1 de polarisation de la réponse immune est l'IFN- γ et la dite protéine spécifique de la 5 polarisation de type Th2 est l'interleukine 4 (IL-4).

34. Animal transgénique non-humain selon la revendication 33 caractérisée en ce que le dit premier transgène code pour la protéine rapporteuse GFP et en ce 10 que le dit second transgène code pour la protéine rapporteuse RFP.

35. Procédé *in vitro* pour caractériser le type de polarisation de la réponse immune induite par un 15 immunogène, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de :

a) mise en contact dudit immunogène avec une cellule selon l'une quelconque des revendications 1 à 28 ;

20 b) détermination si une expression ou des expressions de transgène(s) codant pour au moins une protéine rapporteuse dont l'expression est associée à un type de polarisation de la réponse immune se produit (respectivement « se produisent ») ;

c) facultativement, évaluation quantitative de 25 l'expression du ou des protéine(s) rapporteuse(s) ;

d) caractérisation qualitative, facultativement quantitative, du ou des type(s) de polarisation de la réponse immune.

30 36. Procédé *in vivo* pour caractériser le type de réponse immune induite par un immunogène, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de :

a) mise en contact dudit immunogène avec un animal selon l'une quelconque des revendications 29 à 34 ;

5 b) détermination si une expression ou des expressions de transgène(s) codant pour au moins une protéine rapporteuse dont l'expression est associée à un type de réponse immune se produit (respectivement « se produisent ») dans au moins une cellule dudit animal ;

c) facultativement, évaluation quantitative de l'expression du ou des protéine(s) rapporteuse(s) ;

10 d) caractérisation qualitative, facultativement quantitative, du ou des types de polarisation de la réponse immune.

37. Procédé d'obtention de cellules animales non humaines spécifiques d'un type de polarisation de la réponse immune et/ou d'une fonction effectrice de la 15 réponse immune, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de :

20 a) mise en contact d'un immunogène ou d'un agent pathogène induisant la mise en place une réponse immune /ou d'une fonction effectrice de la réponse immune avec une cellule selon l'une quelconque des revendications 1 à 28 ;

25 b) détermination si une expression du transgène codant pour au moins une protéine rapporteuse, dont l'expression est associée au dit type de polarisation de la réponse immune et/ou au dit type de fonction effectrice de la réponse immune, se produit ;

c) identification des cellules exprimant ladite protéine rapporteuse.

30 38. Procédé d'obtention de cellules animales non humaines spécifiques d'un type de réponse immune et/ou d'une fonction effectrice de la réponse immune, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de :

a) mise en contact d'un immunogène ou d'un agent pathogène induisant la mise en place d'une réponse immune ou d'une fonction effectrice de la réponse immune avec un animal selon l'une quelconque des revendications 29 à 5 34 ;

b) détermination si une expression du transgène codant pour au moins une protéine rapporteuse associée audit type de réponse immune et/ou à une fonction effectrice de la réponse immune se produit dans au moins 10 une cellule dudit animal ;

c) isolement de tout ou partie des cellules de l'animal ;

d) identification parmi les cellules du dit l'animal des cellules exprimant ladite protéine 15 rapporteuse.

39. Procédé selon les revendications 37 et 38 caractérisée en ce que ledit immunogène spécifique d'un type de réponse immune est caractérisé par un procédé 20 selon les revendications 35 ou 36.

40. Procédé selon les revendications 37 à 39 caractérisé en ce que les cellules sont identifiées ou caractérisées par cytométrie de flux.

25

41. Procédé de criblage de composés modulant au moins un type de polarisation de la réponse immune et/ou au moins une fonction effectrice de la réponse immune caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de :

30 a) mise en contact d'une cellule selon les revendications 1 à 28 et/ou d'un animal selon l'une des revendications 29 à 34 avec un immunogène responsable du déclenchement d'une réponse immune et/ou d'une fonction

effectrice, et de manière simultanée ou décalée dans le temps avec ledit composé ;

5 b) la mise en contact d'une cellule selon les revendications 1 à 28 et/ou un animal selon l'une des revendications 29 à 34 avec ledit immunogène de l'étape a) ;

10 c) la détermination qualitative, facultativement quantitative, de l'expression d'au moins un transgène codant pour une protéine rapporteuse dont l'expression est corrélée à un type spécifique de polarisation et/ou d'une fonction effectrice puis comparaison desdites expressions déclenchées en a) et b) ; puis

15 d) l'identification du composé qui module sélectivement la réponse immune et/ou d'une fonction effectrice.

42. Procédé selon la revendication 41 caractérisé en ce que la dite polarisation de la réponse immune est de type Th1.

20

43. Procédé selon la revendication 41 caractérisé en ce que la dite polarisation de la réponse immune est de type Th2.

25

44. Utilisation d'une cellule selon les revendications 1 à 28 ou d'un animal selon les revendications 29 à 34 pour l'analyse et l'étude des mécanismes moléculaires, biologiques, biochimiques, physiologiques et/ou physiopathologiques d'au moins un type de polarisation de la réponse immune et/ou d'un type de fonction effectrice de la réponse immune.

30 45. Transgène comprenant tout ou partie du gène de l'IL-4 murin caractérisé en ce que dans l'extrémité 3'

non codante du gène de l'IL-4 murin sont insérées séquentiellement une séquence IRES, une séquence codant pour une protéine autofluorescente, une cassette de sélection positive encadrée ou non de sites-spécifiques à l'action des recombinases, et caractérisé en ce que une cassette de sélection négative DTA et/ou TK est présente à au moins une des extrémités du transgène.

46. Transgène comprenant tout ou partie du gène murin de l'IFN- γ , caractérisé en ce que dans l'extrémité 3' non codante du gène murin de l'IFN- γ sont insérées séquentiellement une séquence IRES, une séquence codant pour une protéine autofluorescente, une cassette de sélection encadrée ou non de sites-spécifiques à l'action des recombinases, et caractérisé en ce que une cassette de sélection négative DTA et/ou TK est présente à au moins une des extrémités du transgène.

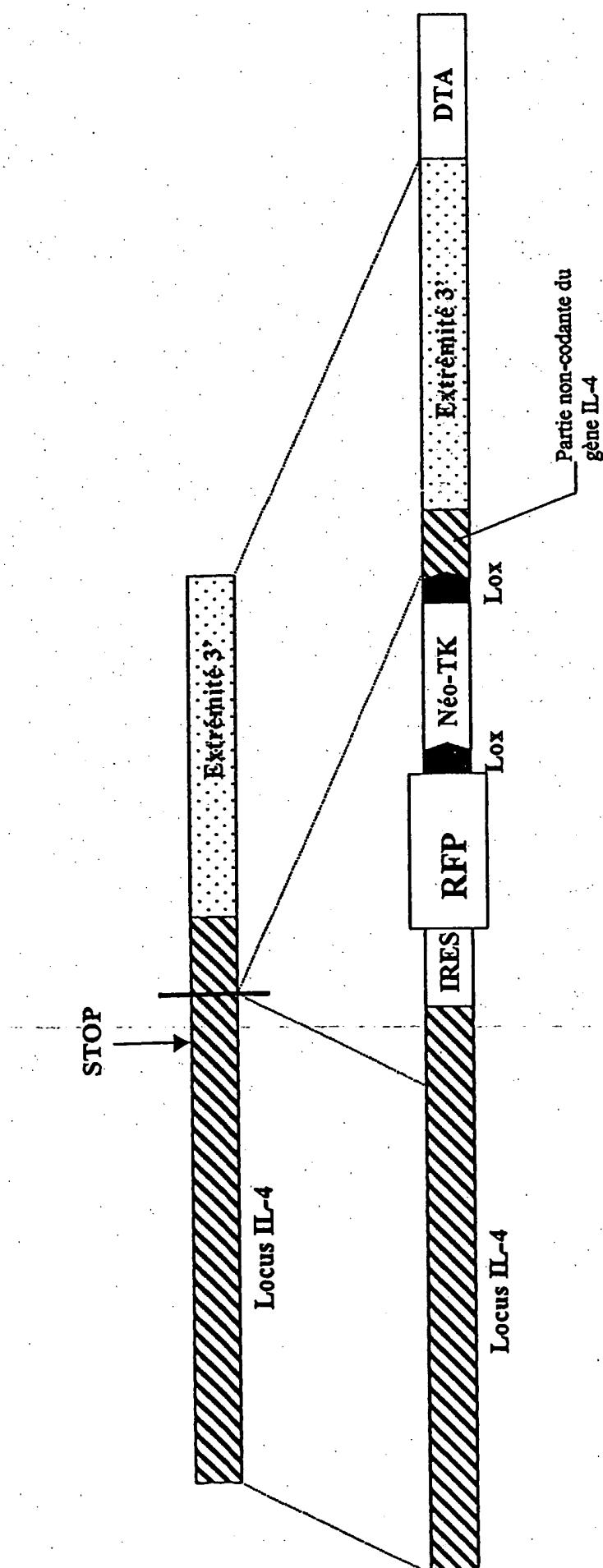


FIGURE 1

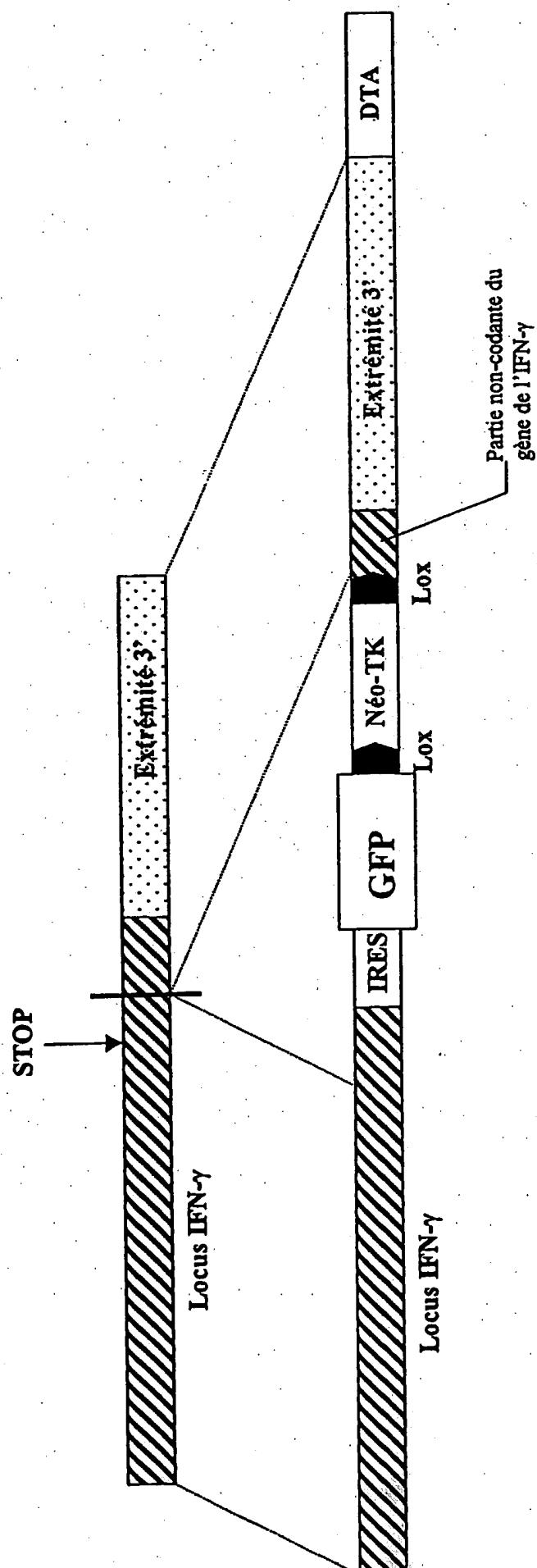


FIGURE 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal	Application No.
PCT/FR 02/00837	

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7	C12N15/10	A01K67/027	C12Q1/00	C12N15/20	C12N15/24
	C12N15/62	C12N5/10			

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, EPO-Internal, PAJ, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>COSTA GL ET AL.,: "Targeting rare populations of murine antigen-specific T lymphocytes by retroviral transduction for potential application in gene therapy for autoimmune disease."</p> <p>J. IMMUNOL., vol. 164, no. 4, 1 April 2000 (2000-04-01), page 3581-90 XP002187202 cited in the application abstract page 3582, left-hand column, paragraph 3; figure 1A page 3585, right-hand column, line 2 -page 3586, left-hand column, line 1</p> <p>----</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	1,2,5-7, 9,11,12, 15,16, 21,22, 24-28, 35,37, 38,40, 43-45

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *8* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 August 2002

Date of mailing of the international search report

20/08/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mateo Rosell, A.M.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal Application No
PCT/FR 02/00837

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WU MIN ET AL: "Use of alveolar macrophages as a Trojan horse to deliver and express IFN-gamma in the lower respiratory tract in immunodeficient mice."</p> <p>FASEB JOURNAL, vol. 15, no. 4, 7 March 2001 (2001-03-07), page A67 XP001051848</p> <p>Annual Meeting of the Federation of American Societies for Experimental Biology on Experimental Biology 2001; Orlando, Florida, USA; March 31-April 04, 2001</p> <p>ISSN: 0892-6638 abstract</p> <p>---</p>	1,2,5-7, 9,11,16, 18-20, 24-26, 35-40, 42,44,46
A	<p>ZHU JINGDONG ET AL: "Three-color flow cytometry analysis of tricistronic expression of eBFP, eGFP, and eYFP using EMCV-IRES linkages."</p> <p>CYTOMETRY, vol. 37, no. 1, 1 September 1999 (1999-09-01), pages 51-59, XP001051827</p> <p>ISSN: 0196-4763 cited in the application abstract</p> <p>page 58, left-hand column, paragraph 1 -page 59, left-hand column, paragraph 1</p> <p>---</p>	1-4,8, 11-15,24
A	<p>LIU XUEDONG ET AL: "Generation of mammalian cells stably expressing multiple genes at predetermined levels."</p> <p>ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 280, no. 1, 10 April 2000 (2000-04-10), pages 20-28, XP002187203</p> <p>ISSN: 0003-2697 cited in the application the whole document</p> <p>---</p>	1,8,11, 12,14, 16,24,40
A	<p>LANTELME E ET AL: "Kinetics of GATA-3 gene expression in early polarizing and committed human T cells."</p> <p>IMMUNOLOGY, vol. 102, no. 2, February 2001 (2001-02), pages 123-130, XP002187204</p> <p>ISSN: 0019-2805 the whole document</p> <p>---</p>	1,5-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal Application No
PCT/FR 02/00837

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SZABO SUSANNE J ET AL: "A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment." CELL, vol. 100, no. 6, 17 March 2000 (2000-03-17), pages 655-669, XP002187205 ISSN: 0092-8674 cited in the application the whole document ----	1,5-7
T	JANKOVIC D ET AL: "Th1- or Th2-cell commitment during infectious disease: an oversimplification? - Response from Jankovic, Liu and Gause" TRENDS IN IMMUNOLOGY, ELSEVIER, CAMBRIDGE, GB, vol. 22, no. 9, 1 September 2001 (2001-09-01), page 482 XP004301114 ISSN: 1471-4906 the whole document ----	1,5-7
T	ROOK G: "Th1- or Th2-cell commitment during infectious disease: an oversimplification?" TRENDS IN IMMUNOLOGY, ELSEVIER, CAMBRIDGE, GB, vol. 22, no. 9, 1 September 2001 (2001-09-01), page 481 XP004301113 ISSN: 1471-4906 the whole document ----	1,5-7
T	JANKOVIC D ET AL: "Th1- and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways" TRENDS IN IMMUNOLOGY, ELSEVIER, CAMBRIDGE, GB, vol. 22, no. 8, 1 August 2001 (2001-08-01), pages 450-457, XP004273455 ISSN: 1471-4906 the whole document ----	1,5-7

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demar internationale No
PCT/FR 02/00837

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12N15/10 A01K67/027 C12Q1/00 C12N15/20 C12N15/24
C12N15/62 C12N5/10

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

WPI Data, EPO-Internal, PAJ, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>COSTA GL ET AL.,: "Targeting rare populations of murine antigen-specific T lymphocytes by retroviral transduction for potential application in gene therapy for autoimmune disease." J. IMMUNOL., vol. 164, no. 4, 1 avril 2000 (2000-04-01), page 3581-90 XP002187202 cité dans la demande abrégé page 3582, colonne de gauche, alinéa 3; figure 1A page 3585, colonne de droite, ligne 2 -page 3586, colonne de gauche, ligne 1 ---- -/-</p>	1,2,5-7, 9,11,12, 15,16, 21,22, 24-28, 35,37, 38,40, 43-45

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

& document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

8 août 2002

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

20/08/2002

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2

NL - 2280 HV Rijswijk

Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,

Fonctionnaire autorisé

Mateo Rosell A.M.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demandé internationale No
PCT/FR 02/00837

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>WU MIN ET AL: "Use of alveolar macrophages as a Trojan horse to deliver and express IFN-gamma in the lower respiratory tract in immunodeficient mice."</p> <p>FASEB JOURNAL, vol. 15, no. 4, 7 mars 2001 (2001-03-07), page A67 XP001051848</p> <p>Annual Meeting of the Federation of American Societies for Experimental Biology on Experimental Biology 2001;Orlando, Florida, USA; March 31-April 04, 2001</p> <p>ISSN: 0892-6638 abrégé</p> <p>---</p>	1,2,5-7, 9,11,16, 18-20, 24-26, 35-40, 42,44,46
A	<p>ZHU JINGDONG ET AL: "Three-color flow cytometry analysis of tricistronic expression of eBFP, eGFP, and eYFP using EMCV-IRES linkages."</p> <p>CYTOMETRY, vol. 37, no. 1, 1 septembre 1999 (1999-09-01), pages 51-59, XP001051827</p> <p>ISSN: 0196-4763 cité dans la demande abrégé</p> <p>page 58, colonne de gauche, alinéa 1 -page 59, colonne de gauche, alinéa 1</p> <p>---</p>	1-4,8, 11-15,24
A	<p>LIU XUEDONG ET AL: "Generation of mammalian cells stably expressing multiple genes at predetermined levels."</p> <p>ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 280, no. 1, 10 avril 2000 (2000-04-10), pages 20-28, XP002187203</p> <p>ISSN: 0003-2697 cité dans la demande le document en entier</p> <p>---</p>	1,8,11, 12,14, 16,24,40
A	<p>LANTELME E ET AL: "Kinetics of GATA-3 gene expression in early polarizing and committed human T cells."</p> <p>IMMUNOLOGY, vol. 102, no. 2, février 2001 (2001-02), pages 123-130, XP002187204</p> <p>ISSN: 0019-2805 le document en entier</p> <p>---</p>	1,5-7
		-/-

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 02/00837

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	SZABO SUSANNE J ET AL: "A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment." CELL, vol. 100, no. 6, 17 mars 2000 (2000-03-17), pages 655-669, XP002187205 ISSN: 0092-8674 cité dans la demande le document en entier ----	1,5-7
T	JANKOVIC D ET AL: "Th1- or Th2-cell commitment during infectious disease: an oversimplification? - Response from Jankovic, Liu and Gause" TRENDS IN IMMUNOLOGY, ELSEVIER, CAMBRIDGE, GB, vol. 22, no. 9, 1 septembre 2001 (2001-09-01), page 482 XP004301114 ISSN: 1471-4906 le document en entier ----	1,5-7
T	ROOK G: "Th1- or Th2-cell commitment during infectious disease: an oversimplification?" TRENDS IN IMMUNOLOGY, ELSEVIER, CAMBRIDGE, GB, vol. 22, no. 9, 1 septembre 2001 (2001-09-01), page 481 XP004301113 ISSN: 1471-4906 le document en entier ----	1,5-7
T	JANKOVIC D ET AL: "Th1- and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways" TRENDS IN IMMUNOLOGY, ELSEVIER, CAMBRIDGE, GB, vol. 22, no. 8, 1 août 2001 (2001-08-01), pages 450-457, XP004273455 ISSN: 1471-4906 le document en entier ----	1,5-7

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale n°
PCT/FR 02/00837

Cadre I Observations – lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. Les revendications n°s _____ se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:

2. Les revendications n°s 1-18, 20, 32, 35-39, 41-44 se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
voir feuille supplémentaire SUITE DES RENSEIGNEMENTS PCT/ISA/210

3. Les revendications n°s _____ sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations – lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.

2. Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prétalent ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.

3. Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°s _____

4. Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°s _____

Remarque quant à la réserve

Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.

Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/SA/ 210

Suite du cadre I.2

Revendications nos.: 1-18, 20, 32, 35-39, 41-44

Les revendications 1-18, 20, 32, 35-39, 41-44 présentes ont trait un produit défini en faisant référence à une caractéristique ou propriété souhaitable, à savoir : des cellules animales transgéniques non humaines exprimant un transgène spécifique et responsable d'un type de polarisation et/ou de fonction effectrice de la réponse immunitaire. Les revendications couvrent tous les produits présentant cette caractéristique ou propriété, alors que la demande ne fournit un fondement au sens de l'Article 6 PCT et/ou un exposé au sens de l'Article 5 PCT que pour un nombre très limité de tels produits. Dans le cas présent, les revendications manquent de fondement et la demande manque d'exposé à un point tel qu'une recherche significative sur tout le spectre couvert par les revendications est impossible.

Indépendamment des raisons évoquées ci-dessus, les revendications manquent aussi de clarté. En effet, on a cherché à définir le produit au moyen du résultat à atteindre. Ce manque de clarté est, dans le cas présent, de nouveau tel qu'une recherche significative sur tout le spectre couvert par les revendications est impossible. En conséquence, la recherche n'a été effectuée que pour les parties des revendications dont l'objet apparaît être clair, fondé et suffisamment exposé, à savoir les parties concernant les produits ont été recherchés, par exemple ceux préparés dans les exemples : exemple 1 et ceux mentionnés dans la description aux pages 19, ligne 13 au page 20, ligne 13.

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications, ou des parties de revendications, ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n'a été établi ne peuvent faire obligatoirement l'objet d'un rapport préliminaire d'examen (Règle 66.1(e) PCT). Le déposant est averti que la ligne de conduite adoptée par l'OEB agissant en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire international est, normalement, de ne pas procéder à un examen préliminaire sur un sujet n'ayant pas fait l'objet d'une recherche. Cette attitude restera inchangée, indépendamment du fait que les revendications aient ou n'aient pas été modifiées, soit après la réception du rapport de recherche, soit pendant une quelconque procédure sous le Chapitre II.